

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Yvette CHARDONNET

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

1^{re} Thèse :

**Contributions à l'étude
de la Physiologie Cellulaire.**

**Les réactions de la cellule à l'agression
par les adénovirus.**

2^e Thèse :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 7 Mai 1963, devant la commission d'examen

MM. G. PERÈS, Président

J. CHANEL

P. LUBET

R. SOHIER

} Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Yvette CHARDONNET

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

1^{re} Thèse :

**Contributions à l'étude
de la Physiologie Cellulaire.**

**Les réactions de la cellule à l'agression
par les adénovirus.**

2^e Thèse :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 7 Mai 1963, devant la commission d'examen

MM. G. PERÈS, Président

J. CHANEL	}	Examineurs
P. LUBET		
R. SOHIER		



UNIVERSITE DE LYON - FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES

MM. LONGCHAMBON, DOUIN, MOUSSA, GAUTHIER Henri

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. LOCQUIN, DE LARAMBERGUE, DOEUVRE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD, DOUIN, EYRAUD Henri

DOYEN

M. BRACONNIER

ASSESEUR

M. MESNARD

PROFESSEURS

M. LONGCHAMBON	Minéralogie	M. CEILLERON	Chimie
M. DEJARDIN	Physique générale	M. BRACONNIER	Calcul Différentiel et Intégral
M. COURTAY	Chimie-physique	M. EYRAUD Charles	Chimie-physique appliquée
M. PRETTE	Chimie industrielle	M. SARAZIN	Physique Nucléaire
M. KUHNER	Botanique	M. PERES	Physiologie
M. MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée	M. MESNARD	Electronique
M. PARIS	Chimie minérale	M. GRANDMONTAGNE	Physique
M. AUMERAS	Chimie	M. BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
M. COLONGE	Chimie organique	M. BOUTILLIER	Minéralogie
M. FLANDRIN	Géologie appliquée	M. LAFOUCRIERE	Physique Nucléaire
M. JANIN	Physique expérimentale	M. DREUX	Chimie organique
M. BERNARD	Physique industrielle	M. TEICHNER	Chimie industrielle
M. DUFAY Jean	Astronomie	M. PAVANS DE GECCATTY	Zoologie
M. NIGON	Zoologie expérimentale	M. DUFAY Maurice	Physique de l'Atmosphère
M. GAUTHIER Henri	Géologie générale	M. MERLIN	Chimie analytique
M. VIRET	Géologie générale	M. FRAISSE	Mathématiques
M. WAUTIER	Zoologie		
M. CHOPIN	Chimie biologique		

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. GAUME	Physique	M. LEGAY	Zoologie expérimentale S. P. C. N.
M. PHILBERT	Physique Nucléaire	M. UZAN	Physique S. P. C. N.
M. COHEN-ADAD	Chimie	M. CHENEVOY	Géologie appliquée
M. DEPRAZ	Physique Nucléaire	M. CHANEL	Psychophysiologie
M. FERON	Mathématiques	M. ASCH	Physique
M. LAFORGUE	Physique	M. GINET	Zoologie
M. DAVID Louis	Géologie générale.	M. MICHEL	Minéralogie
M. GAUTHIER Jean	Chimie	M. MAURY	Mathématiques
		M. DUCET	Biologie végétale

MAITRES DE CONFERENCES

Mlle MAITROT	Physique	M. PERNET	Mathématiques
Mme ERICSON	Physique générale	Mlle GAUTHERON	Chimie biologique
M. GEVIN	Géologie générale	M. BERGEON	Physique C. S. U.
M. PONASSE	Mathématiques	M. MATHIEU	Mécanique des Fluides
M. MARTEL	Mécanique	M. LUBET	Physiologie
M. CHERY	Physique	M. ERBEIA	Physique
M. LEFEBVRE	Mathématiques	M. DESCOTES	Chimie organique
M. D'INCAN	Physique	M. PICARD	Mathématiques
		M. LEMOIGNE	Botanique

MAITRE DE CONFERENCES ADJOINT

M. PIERRON Chimie

SECRETAIRE PRINCIPAL HONORAIRE

M. ROUX

CONSEILLER ADMINISTRATIF

M. BURNET

AVANT-PROPOS

Les recherches exposées dans cette thèse ont été entreprises à l'instigation de feu Monsieur le Professeur CORDIER, de la Faculté des Sciences de Lyon, et de Monsieur le Professeur SOHIER, de la Faculté de Médecine de Lyon.

Elles ont été menées à bien au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon (Directeur : Professeur SOHIER).

Notre profonde et respectueuse reconnaissance va à notre regretté Maître, Monsieur le Professeur CORDIER, qui nous a fait l'honneur de nous aider à réaliser ce travail et à Madame CORDIER qui nous a offert un appui précieux.

Nous voulons exprimer notre profonde reconnaissance et notre respectueux attachement à notre Maître, Monsieur le Professeur SOHIER, qui nous a initiée à la Biologie et nous a guidée pas à pas avec beaucoup de bienveillance, de persévérance et d'affection depuis des années.

A la disparition de Monsieur le Professeur CORDIER, Monsieur le Professeur PERES a bien voulu continuer à s'intéresser à notre travail et a accepté d'être Président de notre thèse. Nous tenons à le remercier vivement.

Nos remerciements vont également à Messieurs les Professeurs CHANEL et LUBET qui nous ont toujours accueillie avec beaucoup de bienveillance et qui ont accepté d'être les juges de ce travail.

Nous voulons exprimer notre gratitude à Monsieur le Professeur GERNEZ-RIEUX qui a accepté d'assurer notre parrainage au C.N.R.S.

Nous tenons à remercier Monsieur le Directeur du Centre National de la Recherche Scientifique pour l'aide matérielle qu'il nous a accordée depuis plusieurs années.

Nous voulons dire notre gratitude à Monsieur le Professeur Agrégé PRUNIERAS qui a su nous apporter confiance et optimisme indispensables.

Que le personnel du Laboratoire d'Hygiène trouve ici l'expression de nos remerciements pour son dévouement et son aide à la réalisation de ce travail.

Nous remercions également le personnel du Laboratoire de Physiologie Générale et de Psychophysiologie pour leur sympathie et leur amitié.

INTRODUCTION

De nombreux travaux ont été effectués au Laboratoire de Physiologie sur les mécanismes des réactions de l'organisme entier à des agressions diverses (PERES, 1955 - 267 ; DESSAUX, 1955 - 69 ; CHANEL, 1956 - 46 ; WORBE, 1959 - 342). Nous avons nous-mêmes étudié l'hémoconcentration chez la Roussette (*Scyllium canicula* L.) soumise à un choc ischémique sous la direction du Professeur D. CORDIER (en collaboration avec G. CORDIER et M. CORDIER, 1954 - 52).

Il nous a été possible, grâce au Professeur R. SOHIER, de poursuivre l'étude des agressions, à l'échelle cellulaire, dans un domaine qui suscite actuellement un grand intérêt en biologie cellulaire, celui des rapports cellules-virus.

C'est donc sous l'angle de la Physiologie de la cellule que nous avons abordé le problème de la pénétration d'acide nucléique étranger dans une cellule en culture, le virus lui-même servant en quelque sorte de véhicule à l'acide nucléique infectant.

I. — Apports et emprunts des techniques virologiques à la physiologie cellulaire.

Parmi les recherches de Physiologie cellulaire, celles sur le couple cellules-virus sont très récentes. Elles s'intéressent à la question essentiellement sous l'angle pathologique.

Cependant l'agression d'une cellule par un virus peut être considérée comme un moyen expérimental pour obtenir des données nouvelles sur la physiologie de la cellule. Nous avons choisi ce moyen pour préciser l'incidence sur le métabolisme cellulaire des différentes étapes d'incorporation et de multiplication d'acide nucléique étranger.

A) Matériel et méthodes.

Nous avons choisi d'une part les cultures cellulaires et d'autre part les Adénovirus comme agresseurs.

Les *cultures de cellules* ont été préférées du fait même qu'elles ont permis la découverte des Adénovirus, en 1953, alors que l'existence de ces virus était seulement soupçonnée depuis 1947.

La technique de culture des cellules vivantes « in vitro » du type CARREL et coll. (1911 - 45) s'étant considérablement améliorée, il est aisé d'obtenir des cultures cellulaires (PAUL, 1959 - 253). Les caractères morphologiques des cellules et leur physiologie

sont connus avec précision. Il est possible de réduire au minimum les variations de leur comportement.

Les *virus* représentent les plus petites unités vivantes dont les propriétés peuvent être étudiées au laboratoire par des méthodes biochimiques, biophysiques et biologiques. C'est la raison pour laquelle ils occupent une place de plus en plus importante dans les sciences biologiques. L'étude des virus n'est « pas simplement un épisode de la lutte contre les maladies infectieuses, elle est devenue une voie d'abord et d'exploration de la physiologie cellulaire » (LÉPINE, 1961 - 207).

Le virus se présente comme un parasite obligatoire de la cellule. Sa multiplication exige « son intégration au métabolisme de la cellule et, ainsi, la cellule reproduit le virus plus que le virus ne se reproduit lui-même ». Il lui faut infecter un tissu sensible.

Parmi les virus, les Adénovirus sont un matériel de choix puisqu'ils entrent dans le groupe des virus animaux à DNA (*). Leur découverte récente (1953) nous offrait un terrain de recherche relativement neuf. De plus, leurs propriétés biologiques ont été bien étudiées au Laboratoire d'Hygiène dans lequel nous avons eu la chance de participer à leur isolement, pour la première fois en France, avec le Professeur R. SOHIER, en 1955.

Si l'on se réfère aux descriptions de Ross et coll. (1957 - 291), SYVERTON (1961 - 321), ANDREWES et coll. (1961 - 5), LWOFF et coll. (1962 - 226), les Adénovirus tiennent une place bien à part, provoquant un effet dégénératif avec accélération du métabolisme des cellules en culture.

B) Les problèmes étudiés.

Nous allons voir comment l'étude des virus apporte sa contribution à la Physiologie cellulaire en recherchant l'incidence de l'action du virus sur les manifestations fondamentales de la vie de la cellule : résistance aux variations du milieu ambiant, échanges au niveau de la membrane cellulaire, nature des constituants cellulaires, nutrition et libération d'énergie et enfin, utilisation de cette énergie.

La mise au contact de cellules cultivées « in vitro » et de particules virales correspond d'une certaine manière à la modification du *milieu environnant* des cellules. Celles-ci auront, par la suite, un comportement différent qu'il paraît intéressant d'étudier. Des modifications extracellulaires et intracellulaires interviennent. Certaines sont spécifiques du virus en cause ; il est nécessaire de les mettre en évidence. C'est ainsi qu'au cours du développement du virus grippal, on a pu reconnaître différentes particules libérées dans le milieu : des particules entières, infectantes, des particules correspondant à l'antigène soluble et des particules hémagglutinantes, de constitution chimique variable. On

(*) Nous employons l'abréviation DNA pour représenter l'acide désoxyribonucléique ou ses sels selon la terminologie internationale, et RNA pour l'acide ribonucléique ou ses sels. (VENDRELY R. et VENDRELY C., 1957 - 330).

sait que, seules, les particules entières contenant acide nucléique et protéines sont capables de provoquer des lésions à d'autres cellules en culture.

Il est évident que la pénétration de particules virales dans la cellule met en jeu certains *mécanismes d'incorporation* de gros édifices macromoléculaires à travers la membrane. La nature de la membrane et les modifications qu'elle subit représentent un point d'intérêt majeur.

Ayant pénétré dans la cellule, les particules de virus sont des éléments étrangers qui vont perturber les *constituants cellulaires*. L'étude des modifications de ces constituants, leur mode d'accoutumance ou de réaction est une occasion de définir des phénomènes biologiques nouveaux.

La *nutrition* de la cellule et les *réactions de libération d'énergie* sont altérées : activité enzymatique, respiration, réactions d'oxydation et de phosphorylation. Des éclaircissements sur les perturbations observées aboutiraient à une meilleure connaissance des rapports cellules-virus.

Enfin, *l'utilisation d'énergie* libérée par la cellule au cours de ses activités, pose le problème de la reproduction des particules virales et des réactions de défense de la cellule.

C) Résultats acquis dans ce domaine

La *nature du milieu environnant* (suspension de virus) a été examinée par des méthodes microscopiques (en particulier microscopie électronique), ou biochimiques sous l'angle quantitatif. Il importait de connaître la structure de la particule d'adénovirus et ses propriétés biologiques.

Notre but a été de considérer l'Adénovirus comme un agresseur vivant qui, placé dans le milieu ambiant des cellules en culture, est capable d'induire un certain nombre de modifications cellulaires. Nous avons voulu étudier les perturbations qu'il produit.

Les *modifications de la membrane cellulaire*, qui permet l'entrée du virus dans la cellule, laissent supposer des phénomènes de transit rappelant la pinocytose ou la micropinocytose. Si les recherches sont nombreuses sur la pénétration de gros édifices macromoléculaires tels que la ferritine dans les hématies (BESSIS et coll. 1958 - 29), peu d'études sont consacrées à celle des virus. Nous avons tenté d'apporter notre contribution par l'étude des surfaces cellulaires au cours de l'agression.

Les perturbations de *l'organisation cellulaire* après agression par un Adénovirus ont fait l'objet de nombreux travaux. Il est facile de suivre l'évolution pathologique de la cellule infectée. Notre but a été de préciser le cycle évolutif des lésions cellulaires, le remaniement du métabolisme des acides nucléiques et des protéines cellulaires.

Les *réactions chimiques et enzymatiques* des cellules infectées par un virus sont considérablement modifiées. La respiration est tout particulièrement altérée : les travaux en cours de ELLINGER et

DUCET * ont montré que les perturbations observées au niveau de la respiration sont fonction du virus en cause.

Cet aspect de la Physiologie nécessite l'utilisation de procédés très perfectionnés, de microméthodes très précises car les variations observées sur une cellule ou sur une population cellulaire sont faibles. Il est actuellement en voie de développement.

La cellule *utilise l'énergie* qu'elle libère lors de la synthèse de ses propres constituants ou celle du virus. On a pu penser que le virus ayant pénétré dans la cellule, déclenchait un mécanisme de duplication, c'est-à-dire la production de molécules identiques à partir d'un modèle. En fait, le virus disparaît pendant un certain temps dans la cellule. Il pourrait y avoir fission ou bien synthèse à partir de sous-produits dégradés. Il y a une association intime du mécanisme de la multiplication du virus au mécanisme du fonctionnement de la cellule infectée et tout spécialement à son mécanisme de reproduction. La question est de savoir si l'acide nucléique du virus impose son motif à la synthèse des protéines de la cellule, et s'il perturbe à la fois le métabolisme et le modèle génétique de la cellule. Trois éventualités peuvent être retenues :

— Dans *une première hypothèse*, l'acide nucléique impose à la cellule la fabrication des nucléoprotéines virales. La cellule meurt par disparation de ses structures normales.

— Selon *une deuxième hypothèse*, la cellule refuse la particule virale et l'assimile pour l'élaboration de ses propres nucléoprotéines. La cellule survit et fabrique une substance spécifique qui lui permettra de réagir à une nouvelle agression.

— Enfin, dans *une troisième hypothèse*, la cellule intègre une partie de l'acide nucléique viral dans ses propres structures et il y a alors infection inapparente. Ce phénomène a été bien étudié avec le bactériophage (SCHAEFFER, 1958 - 299). C'est ainsi que dans la transduction, le génome de la bactérie donatrice se fragmente et est distribué avec les phages libérés au cours de la lyse. Le phage ainsi produit, est absorbé par une bactérie réceptrice, le fragment de génome bactérien qu'il contient est injecté en même temps que son matériel génétique. De même, au cours du phénomène de conversion, apparaissent de nouveaux caractères bactériens héréditaires sous l'influence de la lysogénisation d'une bactérie par un bactériophage. Ce dernier se reproduit à chaque division comme le reste du génome bactérien.

Ce problème apparaît très important pour les virus animaux surtout depuis qu'on a montré les propriétés oncogéniques de certains virus tels que le virus vacuolant SV 40 (EDDY et coll., 1961 - 93), l'adénovirus type 12 (TRENTIN, 1962 - 326).

II. — But de ce travail.

Le but de ce travail s'inscrit dans une perspective très vaste. Il intéresse à la fois les techniques de cultures de tissus, la cytologie, la génétique, la biochimie, l'immunologie.

(*) Nous remercions MM. ELLINGER et DUCET d'avoir bien voulu nous faire part des résultats de leurs travaux.

Nous avons tenté de pénétrer dans les difficultés techniques de façon à établir des protocoles expérimentaux significatifs, en faisant appel à des méthodes variées permettant d'apprécier la capacité réactionnelle des cellules soumises à l'agression par adénovirus.

Les procédés microscopiques appropriés permettent d'étudier le comportement de la cellule et de son agresseur. Des techniques indirectes peuvent mettre en évidence la formation de protéines spécifiques de nature virale ou même la présence de particules virales entières (réactions immunologiques). Les études biochimiques renseignent sur le bouleversement du métabolisme des constituants biochimiques cellulaires (RNA, DNA et protéines) et sur la synthèse des nucléoprotéines virales.

Nous n'avons pas voulu faire une revue exhaustive des multiples techniques utilisables mais mesurer avec un esprit critique les bases sur lesquelles les expériences futures peuvent être conduites, en considérant l'action du virus sous l'angle de la physiologie qualitative.

III. — Plan de travail.

Nous rapporterons en détail les diverses techniques utilisées au cours de ce travail dans la Première Partie.

Dans la Seconde Partie seront exposés les résultats permettant de suivre la multiplication du virus dans les cellules par des méthodes globales.

Dans la Troisième Partie, nous rapporterons les réactions des éléments cellulaires au cours de l'agression virale.

PREMIÈRE PARTIE

METHODES EXPERIMENTALES

UTILISEES DANS NOS RECHERCHES

Il est d'abord nécessaire de définir avec précision les éléments du couple cellules-virus de façon à être sûr que les modifications cellulaires sont bien dues au virus. De plus ces altérations doivent être reproductibles. Ensuite, il est nécessaire de préciser le type d'agression auquel sont soumises les cellules. Ou bien le virus se multiplie dans les cellules et les lésions cellulaires sont dites « spécifiques », ou bien le virus ne se multiplie pas ou très peu et les altérations sont dites « non spécifiques » ou de « type toxique ». On est ainsi amené à prendre la multiplication virale comme élément fondamental de l'expérience. Dans le domaine pratique, on se trouvera donc devant la nécessité d'employer deux groupes de méthodes d'investigation :

— un groupe de méthodes destinées à établir les critères de multiplication virale,

— un groupe de méthodes destinées à apprécier les modifications cellulaires.

CHAPITRE PREMIER

ETABLISSEMENT DU COUPLE CELLULES-VIRUS

Il existe une relation si intime entre les cellules et le virus infectant qu'il est nécessaire de bien connaître la biologie des cellules non infectées : réponses normales aux conditions de culture et de survie des cellules, pour pouvoir interpréter convenablement les réponses cellulaires dues à l'infection.

I. — LES CELLULES.

A. — DONNEES ACTUELLES SUR LES CELLULES UTILISEES

La multiplication des adénovirus a été initialement observée sur des cultures de tissus lymphoïdes infectés naturellement, grâce aux observations de ROWE et coll. (1953 - 293), HILLEMANN et coll. (1954 - 166), NEVA et ENDERS (1954 - 246) et KJELLEN et coll. (1955 - 191).

Par la suite, l'étude des adénovirus a été conduite sur de nombreuses cultures, cellules ou explants, d'origine animale ou humaine.

Schématiquement, les cultures cellulaires employées peuvent se classer en deux catégories : les cultures primaires et les cultures continues.

Parmi les *cultures primaires d'origine animale*, nous citerons : les cultures de reins de singe, les cultures de trachée, de rate, de testicules ou de reins de lapin, les cultures de reins de porc, de veau, les cultures d'embryon de poulet. Les cellules sont obtenues par dispersion à l'aide de trypsine selon la technique proposée par YOUNGNER (1954 - 343).

Les *cultures primaires d'origine humaine* consistent essentiellement en cultures de cellules provenant de membranes amniotiques humaines dispersées par la trypsine selon la technique de DULBECCO et VOGT (1954 - 77) ; cultures de cellules de tissus embryonnaires humains ou de reins humains dissociées par la trypsine selon la méthode de YOUNGNER (1954 - 343) ; cultures de cellules de thyroïde humaine (DUNCAN, 1960 - 78).

Parmi les *cultures continues d'origine animale* figurent : des souches de cellules normales : souche L de fibroblastes de souris isolée à partir de la culture de fibroblastes de EARLE (1943 - 90) ; une souche de testicules et une souche de rate de lapin isolées par le Docteur FEBVRE (cité par BARSKI et coll., 1958 - 22) ; une souche de cœur de singe de SALK et coll. (1957 - 298) ; des souches de poumons de muscle et de reins de bovidés de WARREN et coll. (1957 - 333).

Les *cultures continues d'origine humaine* peuvent être de deux sortes : « normales » (*) ou néoplasiques.

(*) Le mot « normal » est mis entre guillemets à cause des problèmes posés par la possibilité de modifications des cultures, problèmes qui dépassent le cadre de notre sujet.

Seules quelques souches de cellules « normales » ont été entretenues en lignée continue : souche T1 de cellules de rein d'un enfant, isolée par VEEN et coll. (1958 - 329) et maintenue par trypsinations successives ; souche FL (FOGH et coll. 1957 - 117) dérivée de membrane amniotique humaine et la souche TU de fibroblastes humains dérivée de poumons d'adultes, isolée par CAILLEAUX (cité par JAWETZ et coll. 1958 - 43) ; la souche T16 de cellules d'amygdales humaines (EVANS, 1957 - 103).

De nombreuses souches néoplasiques ont été isolées et maintenues en culture continue : celles qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études sont les cellules HeLa isolées par GEY et coll. (1952 - 134), provenant d'un carcinome de l'utérus ; les cellules HEP2 provenant d'un carcinome du larynx, isolées par MOORE et coll. (1955 - 233) ; les cellules KB provenant d'un carcinome buccal isolées par EAGLE (1955 - 81) ; les cellules Détroit 6 provenant de carcinome du poumon isolées par BERMAN et coll. (1955 - 27) ; les cellules Maben isolées de poumon humain par FRISCH et coll. (1955 - 124) ; les cellules DMB et DHov dérivées de la muqueuse nasale isolées par JORDAN (1956 - 180).

Enfin, les cultures d'explants d'origine animale ou humaine, se font à partir de n'importe quel organe découpé en petits fragments maintenus collés au verre par du plasma de poulet. Cette méthode de culture très utilisée de 1952 (ROBBINS et coll. - 282) à 1957 est de moins en moins employée actuellement.

On s'aperçoit ainsi que les adénovirus se multiplient facilement sur de nombreuses cellules. Pour notre étude, nous avons choisi d'abord les cellules HeLa, puis les cellules T1, les cellules amniotiques humaines et les cellules de reins de jeune lapin. Nous rappellerons brièvement leur origine, les méthodes d'obtention et de mise en culture, les facteurs de nutrition et les caractères morphologiques de ces cellules.

B. — LES CELLULES HeLa

1) Origine et subculture.

Les cellules HeLa sont des cellules épithéliales entretenues en lignée continue au Laboratoire d'Hygiène depuis 1955 (souche remise par le Docteur SYVERTON de Minneapolis).

La souche a été isolée en 1952 par GEY et coll. (134) à partir d'implants de carcinome humain du col utérin. Elle a été établie en lignée continue puis adaptée à la préparation de culture cellulaire en nappe par SCHERER et coll. (1953 - 301), SYVERTON et coll. (1954 - 320).

La dispersion par la trypsine a été le seul mode utilisé pendant plusieurs années. Actuellement la nappe cellulaire est détachée du verre soit par grattage suivi d'une dispersion mécanique des cellules à la pipette ou à la seringue, soit par chélation sous l'action du versène par exemple. Au laboratoire, les travaux ont été effectués sur cultures de cellules préparées par versination.

2) Milieu de croissance.

Le milieu de croissance a pour but d'assurer une multiplication cellulaire convenable et reproductible. EAGLE (1955 - 80 ; 1955 - 82 ; 1955 - 83 ; 1955 - 84 ; 1955 - 85 ; 1956 - 86 ; 1956 - 87), EAGLE et coll (1956 - 89), LEVINTOW et coll. (1957 - 214), DARNELL et coll. (1958 - 60 ; 1959 - 61) ont fait de nombreuses recherches pour déterminer les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des cellules HeLa : vitamines, amino-acides, protéines, glucides, sérums. En France, LÉPINE et coll. (1956 - 208 ; 1957 - 210), DANIEL et coll. (1957 - 59) trouvent des résultats comparables.

Primitivement les cellules HeLa se multipliaient dans du milieu contenant 40 p. 100 de sérum humain. Par la suite, EARLE et coll. (1956 - 91) ont montré que les cellules HeLa se cultivent bien avec 10 p. 100 de sérum de poulain. EAGLE (1956 - 87) rapporte dans quelles conditions les cellules HeLa se développent normalement avec moins de 1 p. 100 de sérum. Lo MONACO (1957 - 220) montre comment il obtient des cultures satisfaisantes avec du sérum de veau. MELNICK et coll. (1952 - 232), MELNICK (1955 - 230) introduisent l'utilisation de l'hydrolysate de lactalbumine pour la culture des cellules.

Nous utilisons le milieu de croissance suivant : solution saline de EARLE (1943 - 90) contenant 0,5 g. p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, 0,01 g. p. 100 de yeastolate, 0,21 g. p. 100 de bicarbonate de sodium, 0,002 g. p. 100 d'indicateur coloré le rouge de phénol et 10 p. 100 de sérum de poulain.

Pour la préparation des tubes, le milieu de croissance contient en plus 20 p. 100 de liquide amniotique de bovidés.

3) Milieu de survie.

Il est à noter que les sérums utilisés pour la croissance des cellules peuvent contenir des anticorps et de ce fait empêcher la multiplication d'un virus donné, adénovirus par exemple. (GOLD et coll., 1957 - 144 ; 1962 - 145). Il est donc nécessaire de supprimer tout sérum du milieu où sera introduit le virus.

Ce milieu, dépourvu de sérum ne permet pas de maintenir les cellules en état de multiplication indéfinie. Il ne permet qu'une survie de plusieurs semaines. Aussi est-il appelé « milieu de survie » par opposition au milieu contenant du sérum qui lui, est appelé « milieu de croissance ».

Les milieux varient selon les expérimentateurs, chacun ayant adapté son milieu de survie selon les cellules utilisées et le but recherché. Le milieu 199 de MORGAN et coll (1950 - 235) a souvent été utilisé.

GINSBERG et coll. (1955 - 139) ont proposé d'ajouter du tryptose phosphate broth au milieu de survie, ce qui permet de maintenir en conditions satisfaisantes les cellules HeLa pendant 7 à 10 jours sans changement de milieu. La multiplication des cellules HeLa est d'ailleurs considérable, ce qui laisse à penser que le milieu contenant du tryptose phosphate broth n'est pas seulement un milieu

de survie. Il est intéressant dans quelques cas pour obtenir de hauts titres de virus.

ENDERS (1953 - 14) propose d'utiliser le liquide amniotique de bovidés.

Au cours de nos études le milieu de survie est constitué par une solution saline de EARLE contenant 0,5 g. p. 100 d'hydrolysât de lactalbumine, 0,002 g. p. 100 de rouge de phénol et 0.21 g. p. 100 de bicarbonate de sodium, à laquelle on ajoute 20 p. 100 de liquide amniotique de bovidés. Dans ces conditions les cellules se maintiennent en bon état, apprécié au microscope ordinaire à un grossissement 20 environ, pendant 7 jours. Le changement de milieu de survie à 7 jours permet de poursuivre les observations jusqu'au 10^e ou 14^e jour.

4) Morphologie.

Les cellules se fixent au verre en 4 à 5 heures et se multiplient très vite. Elles présentent un polymorphisme accentué. Elles sont assez volumineuses, leurs noyaux varient par leur taille et leur forme. Elles renferment généralement 6 nucléoles, assez gros, de forme bizarre. On rencontre souvent des cellules géantes multinucléées. La fréquence des figures mitotiques varie selon les cultures. Il arrive qu'il y ait des mitoses anormales avec des figures tripolaires.

5) Intérêt des cellules HeLa.

Les cellules HeLa présentent l'avantage d'être très utilisées dans de nombreux laboratoires. Elles sont bien connues quant à leur culture et à leur préparation. Elles se maintiennent en bon état pendant toute la durée des expériences soit 10 à 14 jours. Elles sont sensibles à une gamme de virus tels que les virus poliomyélitiques, herpétique, vaccinal, les virus de diverses encéphalites ; elles permettent de faire des isollements et des identifications de virus.

Au laboratoire, les cellules HeLa ont permis de réaliser de nombreux travaux sur les complexes virus-anticorps et notamment sur les virus de la poliomyélite et des adénovirus.

C. — LES CELLULES T1

1) Origine et subculture.

Ce sont des cellules épithéliales entretenues en lignée continue par VEEN et coll. (1958 - 329) par trypsination de culture d'implants de rein d'un enfant. Les subcultures ont été établies par trypsinations successives hebdomadaires.

Au laboratoire les subcultures sont obtenues par grattage de la nappe cellulaire toutes les semaines.

2) Milieu de croissance.

Les cultures d'implants se font avec un milieu constitué par une solution saline de HANKS contenant 0,5 g p. 100 d'hydrolysât

de lactalbumine et 40 p. 100 de sérum humain du cordon et par la suite 25 p. 100 seulement de sérum humain du cordon. Lorsque la lignée continue est établie, le sérum humain est remplacé par 5 p. 100 de sérum de poulain ou 5 p. 100 de sérum de veau.

Nous utilisons le milieu suivant : solution saline de HANKS et WALLACE (1949 - 156) contenant 0,5 g p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, 0,035 g p. 100 de bicarbonate de sodium, 0,002 g p. 100 de rouge de phénol servant d'indicateur coloré et 5 p. 100 de sérum de veau.

3) Milieu de survie.

Il a la même composition que le milieu de croissance mais le sérum de veau est remplacé par 20 p. 100 de liquide amniotique de bovidés.

4) Morphologie.

VEEN et coll. (1958 - 329) ont montré que la taille et la forme des cellules T1 est semblable à celles des cellules HeLa lorsqu'elles sont cultivées dans les mêmes conditions. Le noyau des cellules T1 est plus gros et le nombre de nucléoles varie de 1 à 4 en moyenne.

La multiplication se fait par division mitotique.

5) Intérêt des cellules T1.

VEEN et coll (1958 - 329) ont montré que cette lignée de cellules est sensible aux adénovirus. Elle a été peu utilisée sauf par BETZ et MAURIN (1961 - 30).

Ces cellules présentent l'avantage de se multiplier rapidement, d'être faciles à obtenir. Le noyau est volumineux et morphologiquement stable chez les cellules non infectées. Il permet l'observation des principales altérations dues à l'infection virale. On n'observe pas les anomalies mitotiques rencontrées chez les cellules HeLa. D'autre part, nous avons pu apprécier la multiplication de certains virus tant sur cellules HeLa que sur cellules T1. De nombreuses expériences nous ont montré que la multiplication des adénovirus est comparable sur cellules HeLa ou cellules T1. Pour ces raisons nous avons adopté les cellules T1 pour l'étude expérimentale morphologique cytologique et dynamique.

D. — LES CELLULES AMNIOTIQUES D'ORIGINE HUMAINE

1) Origine.

Elles sont préparées par trypsination de membranes amniotiques humaines recueillies immédiatement après l'accouchement. La technique a été mise au point et utilisée avec succès au laboratoire (GAUDIN, 1960 - 129 ; GAUDIN et coll., 1961 - 130).

Dans quelques expériences, nous avons utilisé des sub-cultures obtenues par trypsination de la nappe cellulaire de primo-culture.

2) Milieu de croissance.

De nombreux travaux ont montré que les milieux de culture de cellules amniotiques sont ceux couramment utilisés pour la culture des cellules rénales de singe. Le sérum a pu être du sérum humain, du sérum de poulain, de chèvre ou d'agneau.

Le milieu utilisé au laboratoire est préparé à partir de la solution saline de HANKS, formule proposée par LAHELLE (1956 - 203) contenant 0,5 g p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, 30 p. 100 de liquide amniotique de bovidés et 20 p. 100 de sérum de veau inactivé.

Il a été montré que tous les sérums de veau ne peuvent pas être utilisés pour la culture des cellules amniotiques, certains empêchent la prolifération et ne sont pas améliorés par filtration. Il convient de choisir le sérum qui entre dans la composition du milieu.

3) Milieu de survie.

Le milieu de survie utilisé est constitué par une solution de HANKS (formule de LAHELLE) contenant 0,5 g p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, 20 p. 100 de liquide amniotique de bovidés, 2 p. 100 de sérum de veau inactivé et des antibiotiques (pénicilline : 200 UO par ml, streptomycine : 200 μ g par ml).

4) Morphologie.

La multiplication est relativement lente. Les cellules sont fixées au verre dès la 15^e heure, la division s'effectue par mitoses nettement visibles à 48 heures. Les cultures présentent alors des îlots de quelques cellules. Vers le 5^e ou 6^e jour les îlots forment une nappe transparente presque confluyente.

Il semble que quelques divisions se fassent par amitose.

Les cellules amniotiques se présentent avec un noyau volumineux, des nucléoles bien visibles et un cytoplasme clair et bien étalé.

5) Intérêt des cellules amniotiques humaines.

Les cultures de cellules amniotiques humaines ont été peu utilisées car leur production est irrégulière, les délais d'obtention d'une nappe cellulaire varient de 7 à 10 jours. La multiplication des adénovirus est plus lente que sur cellules HeLa ou T1. Ces cellules présentent surtout l'avantage d'être régulières de taille, assez volumineuses, avec un cytoplasme bien étalé. Les mitochondries sont ainsi très visibles au microscope à contraste de phase.

E. — LES CELLULES DE REINS DE LAPIN

1) Origine.

Elles sont préparées par trypsination de reins de jeune lapin de moins de 4 semaines selon la technique proposée par BALDUCCI et coll. (1956 - 12), une adaptation de la technique de YOUNGNER (1954 - 343).

2) Milieu de croissance.

Le milieu de croissance a la même composition que celui utilisé pour les cellules T1 : hydrolysate de lactalbumine à 0,5 g p. 100 en solution saline de HANKS, (HANKS et WALLACE, 1949 - 156), et 5 p. 100 de sérum de veau.

3) Milieu de survie.

Le milieu de survie a la même composition que celui utilisé pour les cellules T1, le sérum de veau est remplacé par 20 p. 100 de liquide amniotique de bovidés.

4) Morphologie.

La multiplication des cellules de reins de lapin est très lente. Les cellules sont fixées vers la 15^e heure et les divisions sont nettes à 48 heures. A ce moment on remarque quelques îlots de cellules et vers le 6^e ou 7^e jour les îlots forment une nappe presque confluyente. Les cultures semblent présenter au moins 2 sortes de cellules : des cellules d'allure épithéliale et des cellules d'allure fibroblastique.

5) Intérêt des cellules de reins de lapin.

Ces cellules présentent l'avantage d'être faciles à observer au microscope car elles sont bien étalées. Elles restent dans un excellent état pendant la période de survie qui peut atteindre 21 jours au moins.

Les cellules de reins de jeune lapin sont moins sensibles aux adénovirus, les délais d'apparition des lésions spécifiques sont plus longs. Pour ces raisons, à la suite des travaux de KELLY et PEREIRA (1957 - 188), nous avons pensé utiliser ces cellules pour dissocier l'effet viral spécifique de l'effet non spécifique.

II. — L'AGRESSEUR VIRAL : L'ADENOVIRUS.

A. — DONNEES ACTUELLES SUR LES ADENOVIRUS UTILISES

ANDREWES et coll. (1961 - 5) ont proposé de classer les virus en deux grandes catégories selon que l'acide nucléique infectant est un acide désoxyribonucléique : les NITAVIRUS, ou que l'acide nucléique est l'acide ribonucléique : les NANIVIRUS. Dans une telle classification les Adénovirus forment un groupe voisin des NITAVIRUS.

En effet les premières études biochimiques de GINSBERG et coll. (1959 - 140), de GREEN et coll. (1961 - 151), l'épreuve à la désoxyribonucléase contrôlée au microscope électronique par EPSTEIN et coll. (1960 - 101), permettent de penser que les adénovirus contiennent des DNA et sont privés de RNA. Ils manquent probablement de systèmes enzymatiques de synthèse.

Les particules d'adénovirus ont une taille de 70 à 100 m μ ; elles sont sphériques ou hexagonales selon le mode d'observation. Elles s'organisent pour donner une figure rappelant un icosaèdre (HORNE et coll. 1959 - 170). Elles sont résistantes à l'éther.

Les particules virales provoquent des altérations cellulaires typiques sur les cultures dont nous venons de parler (cellules animales ou humaines). Ces modifications cellulaires sont reproductibles par passages successifs comme l'ont montré ROWE et coll. (1953 - 293), HILLEMAN et coll. (1954 - 166), KJELLEN (1955 - 191), NEVA et ENDERS (1954 - 246). Les lésions observées sont essentiellement nucléaires. Ces altérations cellulaires sont supprimées si l'effet du virus est neutralisé par un sérum spécifique des adénovirus.

Ces virus sont capables de produire une fraction soluble antigénique spécifique sur cultures cellulaires décelable par la réaction de fixation du complément. La fraction soluble est apparue différente de la fraction infectante.

Les adénovirus ne sont pas pathogènes pour les œufs embryonnés ou les animaux de laboratoire : cobaye, rat, lapin.

On reconnaît plusieurs types antigéniques de virus. Le nombre de types différents identifiés dans le règne animal va en augmentant. HUEBNER et coll. (1954 - 175) distinguent 6 types d'adénovirus d'origine humaine. En 1956, ROWE et coll. (295) décrivent 14 types d'adénovirus : 12 types d'origine humaine et 2 types d'origine simienne. En 1958, ROWE et coll. (296) différencient 24 types d'adénovirus dont 18 d'origine humaine et 6 d'origine simienne. En 1961, ROSEN et coll. (296) identifient encore 4 adénovirus d'origine humaine types 25 à 28. De plus, il a été possible d'isoler des virus d'origine animale, autres que les virus simiens, dont les caractères rappellent ceux des adénovirus humains : virus GAL de la poule (SHARPLESS et coll., 1958-306 ; FONTES et coll., 1958-121), virus de la souris de HARTLEY et coll. (1960-160), virus du chat (CRANDELL et coll., 1960-56), virus du chien (KAPSENBERG, 1959-183 ; HELLER et coll., 1960-162), virus des bovidés (KLEIN et coll., 1959-196 ; 1960-197).

Nous avons étudié, d'une part les adénovirus types 1 à 17, souches remises comme prototypes par le laboratoire du Professeur HUEBNER ou le laboratoire du Professeur SVEDMYR, et les souches isolées et typées au laboratoire. Ces types 1 à 17 sont tous d'origine humaine.

D'autre part, les types 1 et 5 ont fait l'objet de recherches particulières.

B. — LES RAISONS DU CHOIX

Nous avons adopté l'adénovirus comme agresseur de la cellule car il a une multiplication plus lente que certains virus comme celui de la Poliomyélite par exemple. Les modifications cellulaires produites sont importantes, typiques et reproductibles. La lenteur de l'évolution permet une bonne observation.

Nous avons choisi les types 1 et 5 pour des recherches particulières car ils présentent des caractères spéciaux. Les adénovirus types 1 et 5 provoquent souvent 2 sortes de modifications cellulaires : d'une part des altérations spécifiques dues à la multiplication virale, d'autre part des lésions provenant d'un effet non spécifique souvent appelé effet « toxique ». L'adénovirus type 5

provoque la formation de masses cristallines particulièrement spectaculaires, que nous avons étudiées.

De plus, ces virus sont bien connus au Laboratoire d'Hygiène où ils ont fait l'objet des premiers travaux effectués en France en 1956 (SOHIER, 310). Ces virus ont retenu notre attention sur le plan cytologique avec PRUNIERAS et SOHIER, mais aussi sur le plan immunogène.

Nous avons aidé à l'isolement et à l'identification de 55 souches obtenues à partir de prélèvements de selles ou de prélèvements pharyngés (BENSIMON, 1956 - 26 ; FLEURETTE, 1961 - 116 ; HENRY, 1961 - 165).

Nous avons participé à la préparation de suspensions virales des 17 types pour l'immunisation d'animaux. Chaque suspension a été titrée pour connaître son pouvoir infectieux. Les sérums obtenus contenant des anticorps spécifiques de type sont titrés en neutralisation en présence de virus de types homologues et hétérologues.

Nous avons également préparé depuis 1955 les suspensions de virus types 1, 7 ou 11 servant dans les réactions de fixation du complément (fraction soluble) permettant de détecter la présence d'anticorps chez les sujets ayant présenté une affection à adénovirus. Ces mêmes suspensions nous ont servi de témoins positifs dans les réactions de fixation du complément effectuées au cours de ce travail.

III. — MODE PRATIQUE D'ETABLISSEMENT DU COUPLE CELLULES-VIRUS.

Le virus et les cellules étant connus, il reste à définir les conditions dans lesquelles les deux éléments de l'expérience sont mis en contact. Plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle essentiel.

Mise à part la question de concentration du virus qu'on envisagera plus loin, la reproductibilité d'une expérience dépend du rapport existant entre la quantité de virus, la quantité de cellules, la quantité de milieu liquide et la phase gazeuse. Il est donc nécessaire de mettre au point le rapport idéal entre ces quatre éléments en fonction du récipient dans lequel se fait l'expérience.

Or, ce récipient varie considérablement selon le mode d'observation des cellules que l'on désire utiliser.

A. — PROBLEME DU RECIPIENT

1) Cultures cellulaires en tubes en vue de l'appréciation globale de l'état des cellules.

La culture des cellules se fait en tubes de 15×110 mm. Le volume de milieu de croissance et de survie est constant, soit 1 ml. Le nombre de cellules et l'âge des cellules utilisées varient selon la souche considérée :

a) Cellules HeLa :

Les tubes sont ensemencés à raison de 30.000 cellules par tube. Ils sont utilisés au 4^e jour d'incubation à 35°C en position

stationnaire, soit une moyenne de 100.000 cellules au moment de l'introduction du virus. Les cellules sont en îlots assez serrés.

b) *Cellules T1 :*

Les tubes sont préparés à raison de 50.000 cellules par tube et utilisés après 48 heures d'incubation à 35°C en position stationnaire, soit une moyenne de 100.000 cellules au moment de l'inoculation du virus. Les cellules sont groupées en îlots très voisins.

c) *Cellules de reins de jeune lapin :*

Les tubes sont préparés à raison de 150.000 cellules et utilisés après 5 à 7 jours d'incubation à 35°C en position stationnaire, lorsque les cellules forment une nappe.

d) *Cellules amniotiques humaines :*

La suspension cellulaire est répartie en tubes 12×130 mm à raison de 250.000 à 300.000 cellules. Les tubes sont incubés en position stationnaire à 35°C. Le milieu est changé après 48 heures d'incubation, remplacé par du milieu nutritif. Les tubes sont inoculés avec une suspension de virus vers les 6^e ou 7^e jours, lorsque les cellules forment une nappe.

2) **Cultures cellulaires sur lames minces en tubes spéciaux en vue de l'observation de détails morphologiques.**

La culture des cellules se fait sur lamelles 12×32 mm introduites dans des tubes présentant un fond plat appelés tubes de BARSKI (1956 - 16).

Le volume de milieu de croissance introduit est toujours 2 ml par tube et celui du milieu de survie est de 2 ml ou 1,5 ml selon les expériences.

Le nombre de cellules et l'âge des cellules utilisées varient selon la souche considérée et le type d'expérience.

a) *Cellules HeLa :*

Les tubes à lamelles sont préparés à raison de 100.000 cellules par tube, incubation à 35°C pendant 4 jours.

b) *Cellules T1 :*

Dans les expériences sur la cinétique de la production de virus infectant ou de fraction soluble, les tubes à lamelles sont préparés à raison de 200.000 cellules et incubation à 35°C pendant 4 jours.

Pour les expériences comportant essentiellement des études cytologiques, cytochimiques ou microcinématographiques, les tubes sont préparés à raison de 100.000 cellules et incubation à 35°C pendant 2 jours.

c) *Cellules de reins de jeune lapin :*

Les tubes à lamelles sont préparés à raison de 300.000 cellules, incubation à 35°C pendant 5 à 7 jours.

d) *Cellules amniotiques humaines :*

Les tubes à lamelles sont préparés à raison de 500.000 à 600.000 cellules. Les tubes sont utilisés à 7 ou 10 jours après incubation à 35°C lorsque les îlots cellulaires deviennent confluents.

3) **Cultures cellulaires en chambres pour la microcinématographie.**

Nous avons utilisé deux types de montage : la chambre à perfusion de BARSKI et ROBINEAUX (1956 - 20) et la chambre de CRUICKSHANK et coll. (1959 - 57).

a) *Chambre de Robineaux :*

Elle comporte l'utilisation de cultures sur lamelles 12×32 mm après incubation des cellules à 35°C et même l'incubation cellules-virus. Le volume de la chambre est très faible : 768 mm³. Ce montage nécessite une perfusion continue des cellules pour les maintenir en bon état pendant 2 à 3 jours.

Nous avons utilisé soit les cellules T1, à raison de 100.000 cellules pour 2 ml de milieu de croissance, soit les cellules rénales de lapin à raison de 300.000 cellules pour 2 ml de milieu de croissance.

Les cellules observées ne sont pas toujours strictement dans le même état physiologique que celui offert par le tube de culture, aussi avons-nous préféré le deuxième procédé.

b) *Chambre de Cruickshank :*

Elle présente l'avantage de préparer les cultures cellulaires directement sur lamelle 30×30 mm placée sur la chambre, de respecter les rapports liquide-phase gazeuse et de permettre l'introduction du virus en maintenant les conditions physiologiques des cultures obtenues dans les tubes. Il n'y a pas de transfert des cultures d'un tube à une chambre. Il en résulte que les conditions de culture sont les mêmes du début à la fin de l'expérience. De plus, les perfusions ne sont pas nécessaires, en raison de la présence d'un fossé, récepteur de gaz à la périphérie de la zone liquide de culture.

La surface de culture est de 314 mm² et correspond à une phase liquide d'un volume de 300 mm³. Le volume total de la chambre étant 500 mm³, la différence correspond à la phase gazeuse.

Nous avons utilisé les cellules T1 à raison de 70.000 cellules par lamelle.

Nous avons été amenés à utiliser ce type de chambre à la suite d'essais de culture de cellules épidermiques jusque-là difficiles à obtenir, par suite du manque d'oxygénation (en collaboration avec PRUNIERAS - 277).

4) **Cultures cellulaires en flacons pour le renouvellement du stock de suspension de virus.**

Les stocks de suspension de virus sont réalisés essentiellement sur cultures de cellules HeLa en couche monocellulaire

obtenue sur grandes fioles : fiole de KOLLE ensemencée avec 5 millions de cellules dans 40 ml de milieu de croissance et incubation à 35°C pendant 3 jours ; fiole de ROUX d'un litre ensemencée avec 14 millions de cellules dans 70 ml de milieu de croissance et incubation à 35°C pendant 3 jours.

Au moment de l'introduction du virus, le milieu de croissance est remplacé par 30 ml de milieu de survie dans les fioles de KOLLE, 60 à 70 ml dans les fioles de ROUX.

Ces cultures présentent l'avantage de fournir une quantité importante de suspension de virus qui servira au cours des expériences. Chaque suspension est soumise aux contrôles permettant d'établir ses caractéristiques.

B. — PROBLEME DE LA CONCENTRATION EN VIRUS

Le choix de la concentration en virus varie en fonction de deux facteurs complémentaires : la vitesse de dégénérescence et le type de réceptif.

Toutes les déterminations de concentration en virus ont été finalement choisies d'une manière empirique. Il était en effet impossible d'échapper à cet empirisme pour la raison que la seule méthode directe permettant de ramener les modifications cellulaires à la particule virale, unité élémentaire, n'est possible que selon la méthode des plages proposées par DULBECCO (1952 - 76) pour le virus poliomyélique. L'application de cette méthode aux adénovirus n'a été réalisée de manière satisfaisante qu'en 1961 par KJELLEN (194).

La culture des cellules se fait en flacons de telle sorte que la nappe soit monocellulaire et continue. Le virus est mis directement en contact avec les cellules à de très faibles dilutions et réparti en film très mince. Après adsorption des particules virales infectantes, les cellules sont recouvertes d'une couche de milieu nutritif contenant de l'agar. La multiplication du virus a lieu au sein de la cellule et on repère les foyers de cellules détruites par l'adjonction de colorant vital, le rouge neutre. Les cellules infectées décolorent la couche d'agar par « plages » qu'il est alors facile de compter. On détermine ainsi l'unité infectante appelée PFU (plaque forming unit.). Cette unité a l'avantage d'être petite et de permettre la détection de faibles quantités de virus.

De plus, si la méthode des « plages » est réalisable dans des réceptifs de grandes dimensions, elle n'a pas pu être utilisée dans les montages de petite taille nécessaire pour la microscopie à l'immersion et la microcinématographie.

Pour ces raisons, les concentrations en virus ont été déterminées en fonction des 4 critères d'observation suivants :

- 1) reproductibilité dans le temps d'une dégénérescence donnée,
- 2) observation au petit grossissement d'une séquence toujours identique des modifications cellulaires,
- 3) observation dans des délais comparables des inclusions intranucléaires spécifiques,

— 4) existence d'une multiplication virale reproductible exprimée par le pouvoir infectieux.

Dans ces conditions, il est apparu que les concentrations de virus à choisir étaient différentes selon les récipients. Les critères énumérés n'ont pas toujours la même importance, leur ordre de préférence varie selon le récipient.

1) Cultures en tubes en vue de l'appréciation globale de l'état des cellules.

Les critères indispensables sont 1, 2 et 4.

Ces cultures cellulaires sont généralement mises en présence de doses décroissantes de virus : suspension non diluée puis diluée de 10 en 10 généralement.

Les cellules sont ainsi mises en présence de fortes concentrations de virus (1.000 à 10.000 DICT50 (*) pour 100.000 cellules HeLa par exemple), et en présence de très faibles concentrations (0,1 ou 0,01 DICT50 pour 100.000 cellules HeLa par exemple).

L'observation des lésions cellulaires globales est faite dans ces conditions, tant sur cellules HeLa que sur cellules T1 avec les adénovirus types 1 à 17. Elle a été faite avec les adénovirus types 1, 5, 7 et 11 sur les cellules de reins de lapin et les cellules amniotiques humaines.

Il apparaît indispensable de reproduire l'expérience au moins trois fois pour connaître les caractéristiques de la suspension virale.

Dans quelques expériences avec les adénovirus type 1 ou 5 infectant des cellules T1 ou des cellules de reins de lapin, nous avons utilisé une seule dilution de virus.

Pour l'adénovirus type 1 sur cellules T1, nous avons utilisé le lot 5-670 à la dilution $10^{-1,39}$ soit 13 DICT50 et 10^{-2} soit 1,6 DICT50 pour 100.000 cellules. Sur cellules de reins de lapin nous avons utilisé le lot 5-400 à la dilution $10^{-1,39}$ soit 70 DICT50 pour 200.000 cellules environ.

A la dilution choisie, la dégénérescence des cellules n'est ni trop rapide ni trop lente. Il est possible d'étudier l'apparition et l'évolution des lésions globales de la nappe cellulaire, l'apparition et l'évolution de la fraction virale, infectante et l'apparition et l'évolution de la fraction soluble antigénique.

2) Cultures cellulaires sur lames minces en tubes spéciaux en vue de l'observation de détails morphologiques.

Les 4 critères cités précédemment sont nécessaires.

Dans quelques cas, nous avons reproduit l'expérience précédente en introduisant des doses décroissantes de virus sur les cultures cellulaires. Nous avons pu ainsi étudier les modifications

(*) DICT50 : Dose Infectante sur Culture de Tissu 50 p. 100 - dose infectante de virus provoquant des lésions dans 50 p. 100 des tubes de culture.

cellulaires observées à partir des différents types d'adénovirus, types 1 à 17 sur les cellules HeLa ou T1, les types 1, 5, 7 et 11 sur les cellules de reins de lapin et les cellules amniotiques. Nous avons ainsi étudié le rôle de la dose de virus sur les cellules, la sensibilité des différentes cellules.

Dans d'autres expériences, lorsque la suspension virale est connue avec précision quant aux modifications cellulaires globales observées, cette suspension est utilisée à une dilution telle que nous obtenions régulièrement la succession des lésions établies au cours de nos recherches dans un temps déterminé.

Pour l'adénovirus type 1 sur cellules T1, nous avons utilisé successivement les lots : 5-130 à la dilution $10^{-1,39}$ soit 300 DICT50 environ, 5-400 à la dilution 10^{-2} soit 300 DICT50 environ pour 200.000 cellules environ. Pour l'adénovirus type 5 sur cellules T1 nous avons utilisé les lots 5-126 à la dilution $10^{-1,39}$ soit 30 DICT50, 5-912 à la dilution 10^{-2} soit 12 DICT50 et 5-985 à la dilution $10^{-2,30}$ soit 2.400 DICT50.

Lorsque nous employons les cellules de reins de lapin ou les cellules amniotiques humaines, les délais de dégénérescence sont plus longs même avec une dose de virus augmentée.

3) Cultures cellulaires en chambres pour la microcinématographie.

Les critères majeurs sont 1, 2 et 3.

Il est tout particulièrement important de pouvoir reproduire la même expérience avec les mêmes lésions cellulaires dans un délai donné. La difficulté la plus grande est de pouvoir suivre un groupe de cellules avant et après infection.

C'est ainsi qu'au cours de nos travaux sur cellules T1 cultivées sur lamelles 12×32 mm nous avons utilisé 20 à 25 DICT50 pour l'adénovirus type 1 (lot 5-400) et 1.000 à 2.000 DICT50 pour l'adénovirus type 5 (lots 5-126 ; 5-912 ; 5-985).

Le montage de la lamelle dans la chambre de ROBINEAUX a pu être réalisé après 2 heures, 3 heures..., 24 heures de contact cellules-virus. Dans quelques cas, le montage a été effectué avant l'infection et le virus introduit dans la chambre à une dilution plus faible, de telle sorte que la même quantité de virus se trouve en présence des cellules mais ceci sous un volume très petit : 0,8 ml (au lieu de 2 ml dans les tubes à lamelle). Enfin nous avons étudié l'influence de fortes doses de virus sur les cellules.

Pour les travaux effectués sur chambres de CRUICKSHANK portant les cellules T1, nous avons utilisé l'adénovirus type 5, lot 5-1491. Le virus est introduit en mettant la même quantité de virus que sur tube à lamelle mais sous un volume 5 fois plus faible pour la même quantité de cellules (100.000 environ).

4) Cultures cellulaires en flacons pour le renouvellement du stock de suspension de virus.

Les critères 1 et 4 sont indispensables.

La concentration en virus est déterminée empiriquement.

Elle est choisie de telle sorte qu'on ait une dégénérescence des cellules dans un délai pouvant correspondre à une multiplication virale spécifique. La séquence des lésions globales établie précédemment doit être retrouvée.

La dégénérescence a généralement lieu en 2 à 4 jours selon les types de virus utilisés. Elle peut être de 6 à 8 jours pour les types provoquant une dégénérescence cellulaire particulièrement lente (types 8, 9, 10, 13, 15 17).

La quantité de virus introduite sur les cultures cellulaires en flacons varie de 70 à 10^3 DICT50 pour 10×10^6 de cellules selon les types de virus considérés.

Dans une expérience concernant l'adénovirus type 5, nous avons introduit une très forte dose de virus 3×10^6 DICT50 (lot 5-985) de façon à infecter le maximum de cellules au même moment et à étudier l'apparition et l'évolution du matériel infectant et du matériel soluble, les remaniements dans la teneur en acides nucléiques et en protéines cellulaires.

CHAPITRE II

METHODES D'INVESTIGATION DE L'AGRESSION CELLULAIRE PAR L'ADENOVIRUS

Nous envisagerons successivement les méthodes permettant d'apprécier la présence et la multiplication du virus dans la cellule et les méthodes permettant d'étudier le comportement de la cellule au cours de l'agression.

I. — MOYENS D'APPRECIATION DE LA MULTIPLICATION VIRALE INTRA-CELLULAIRE ET DE L'EFFET TOXIQUE.

Pour caractériser la présence ou la multiplication du virus dans la cellule, nous cherchons à mettre en évidence les propriétés spécifiques des adénovirus décrites plus haut.

Les méthodes d'identification du virus peuvent être directes, quantitatives ou indirectes (techniques immunologiques) décelant la production d'un matériel infectant et d'un matériel soluble dans les cellules-hôtes.

A. — METHODES DIRECTES QUANTITATIVES

Ces méthodes permettent l'étude des variations des constituants de la cellule et du milieu ambiant au cours de l'infection virale : acides nucléiques et protéines. Nous avons choisi les méthodes récentes proposées par SCHMIDT et THANNHAUSER (1945 - 303), SCHNEIDER (1945 - 304) et OGUR et ROSEN (1950 - 250). Le choix de la technique a été très difficile car les quantités de substances extraites sont très petites et les dosages risquent de ce fait d'être entachés d'erreurs.

Cette technique nous a permis cependant de compléter notre étude immunologique.

Nous avons profité du fait que la technique utilisée dans nos expériences, a été appliquée avec succès par le Docteur HORWATH, de Lausanne, à l'étude du développement du virus vaccinal sur cultures cellulaires d'origine humaine (1962 - 171).

La technique adoptée est la suivante :

— Des fioles de KOLLE contenant des cellules HeLa âgées de 4 jours, maintenues à 35°C etensemencées à raison de 5×10^6 cellules par fiole dans du milieu de croissance, nous sont remises.

— Le milieu de croissance est éliminé et remplacé par 30 ml de milieu de survie contenant de l'adénovirus type 5. Les fioles sont placées à 35°C pendant des temps variables : 2, 8, 24, 48 et 72 heures.

— Pour chaque fiole ayant été retirée dans ces délais, les

cellules sont détachées du verre. Le milieu contenant les cellules est centrifugé à 3.000 tours/minute pendant 5 minutes pour séparer le milieu et les cellules. Les cellules sont lavées, pesées et remises en suspension dans du sérum physiologique à raison de 22 ml par gramme de poids humide.

— La suspension de cellules est soumise à une homogénéisation à froid par broyage avec un broyeur type VIRTIS à 45.000 tours/minute pendant 3 minutes, permettant la séparation cytoplasme-noyau. L'homogénéisat est alors conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

— Homogénéisats cellulaires et milieux sont soumis à une extraction pour mesurer les variations d'acides nucléiques.

— L'utilisation d'acide perchlorique, à 5 p. 100 à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 3 heures, assure la précipitation des acides nucléiques et des protéines. Une centrifugation à faible vitesse permet de séparer le surnageant contenant les nucléotides acido-solubles.

— Le culot est repris pour l'extraction des phospholipides par éthanol, éthanol-éther (3—1) et éther. La suspension dans l'éther est mise au bain-marie bouillant pendant une minute. La centrifugation à faible vitesse permet l'élimination de l'éther. Elle est suivie d'une évaporation sous vide.

— La poudre obtenue contenant DNA, RNA et protéines est pesée lorsqu'il s'agit d'extraction des homogénéisats cellulaires : on a ainsi le poids de tissu sec.

— Le fractionnement des RNA est assuré par précipitation des DNA et des protéines, à froid pendant 15 heures dans l'acide perchlorique à 2 p. 100 et centrifugation.

— Le DNA du culot est séparé des protéines par utilisation d'acide perchlorique à 10 p. 100 à 90°C pendant 15 minutes.

TABLEAU D'EXTRACTION 1

Préparation des stocks

Cellules détachées du verre + milieu
centrifugation 3.000 tours/minute 10 minutes

Surnageant S conservé -20°C Stock	Culot cellulaire C lavé 3 fois eau physiologique
	Suspension cellulaire (poids humide 1/22)
	Broyage VIRTIS 45.000 tours/m 3 minutes
	Homogénéisat cellulaire H conservé -20°C Stock

TABLEAU 2

Extraction du surnageant S du tableau 1

Nucléotides acido-solubles

1 ml surnageant S + 1 ml ClO_4H à 5 p. 100 centrifugation		3 heures à + 4°C
culot CS_1	surnageant SS_1	
culot CS_1 + 1 ml ClO_4H à 5 p. 100 lavage 2 fois centrifugation		NUCLEOTIDES ACIDO-SOLUBLES
culot CS_2	surnageant SS_2	

TABLEAU 3

Extraction du culot CS_2 du tableau 2

Phospholipides

culot CS ₂ + 1 ml éthanol 3 fois centrifugation		PHOSPHOLIPIDES
culot CS ₃	surnageant SS ₃	
culot CS ₃ + 1 ml éthanol-éther (3-1) 2 fois centrifugation		
culot CS ₄	surnageant SS ₄	
culot CS ₄ + 1 ml éther bain-marie bouillant 1 minute 2 fois centrifugation		
culot CS ₅	surnageant SS ₅	

évaporation sous vide

TABLEAU 4

Extraction du culo CS_5 du tableau 3
RNA - DNA - PROTEINES

culot CS ₅ + 1 ml ClO ₄ H à 2 p. 100 15 heures à + 4°C centrifugation une fois		
culot CS ₆	surnageant SS ₆	RNA
culot CS ₆ + 1 ml ClO ₄ H à 2 p. 10 20 minutes à + 4°C centrifugation une fois		
culot CS ₇	surnageant SS ₇	
culot CS ₇ + 1 ml ClO ₄ H à 10 p. 100 15 minutes à 90°C centrifugation une fois		
culot CS ₈	surnageant SS ₈	DNA
culot CS ₈ + 1 ml ClO ₄ H à 10 p. 100 15 minutes à 90°C		
culot CS ₉	surnageant SS ₉	
culot CS ₉ + 1 ml NaOH N bain-marie bouillant 15 minutes		
culot CS ₁₀	surnageant SS ₁₀	PROTEINES
culot CS ₁₀ + 1 ml NaOH N bain-marie bouillant 15 minutes		
culot CS ₁₁ éliminé	surnageant SS ₁₁	

TABLEAU 5

Résumé de l'extraction de l'homogénéisat H du tableau 1
(Méthode superposable à celle employée pour le surnageant S)

+	SH ₁	}	NUCLEOTIDES ACIDO-SOLUBLES
	SH ₂		
+	SH ₃	}	PHOSPHOLIPIDES
	SH ₄		
+	SH ₅		
+	SH ₆	}	RNA
	SH ₇		
+	SH ₈	}	DNA
	SH ₉		
+	SH ₁₀	}	PROTEINES
	SH ₁₁		

— Enfin, les protéines du culot restant sont extraites par la soude normale portée à ébullition pendant 15 minutes.

Le procédé d'extraction est résumé dans les tableaux 1, 2, 3, 4 et 5.

Nous avons effectué la lecture au photomètre type JOBIN et YVON, en lumière ultraviolette, pour chaque fraction obtenue : nucléotides acidosolubles à 258 mμ, RNA et DNA à 270 mμ et protéines à 290 mμ. Ces longueurs d'onde ont été choisies en fonction des résultats exprimés par HOTCHKISS (1957 - 172) et DAVIDSON (1960 - 62) et des produits nous ayant servi pour établir nos courbes étalons.

De plus, après avoir effectué les mesures de DNA et de RNA, en lumière ultraviolette, nous avons mesuré les quantités de phosphore présentes dans les deux fractions, et les quantités de pentose et désoxypentose présentes dans le RNA et dans le DNA, par des réactions colorées.

La réaction du phosphore est celle proposée par FISKE et SUBBAROW (1925 - 113) au molybdate d'ammonium, sulfite de soude et hydroquinone. La lecture au photomètre se fait en lumière ordinaire à 800 m μ .

La réaction colorée du pentose est celle de MEJBAUM (289) modifiée, utilisant le chlorure cuivrique comme catalyseur et l'orcinol. L'absorption maximum au photomètre en lumière ordinaire se situe autour de 670 m μ .

La réaction colorée du désoxypentose est celle de DISCHE (1955 - 72) faisant intervenir la diphénylamine en solution dans l'acide acétique glacial et l'acide sulfurique concentré. La lecture au photomètre se fait à 595 m μ en lumière ordinaire.

Nous avons établi des courbes étalons de DNA, de protéines, de phosphore, de pentose et de désoxypentose. Les produits utilisés proviennent de la firme MERCK.

B. — METHODES INDIRECTES

Ces méthodes permettent d'apprécier l'effet du virus sur une population cellulaire soit par des modifications de la morphologie cellulaire globale, soit par l'apparition d'un facteur soluble décelable par ses propriétés antigéniques.

1) Méthodes faisant intervenir les modifications cellulaires morphologiques.

La méthode couramment utilisée est celle des dilutions de la suspension de virus recueillie au cours des expériences. Chaque dilution est introduite sous un volume de 0,1 ml dans 5 tubes de culture (15×110 mm) contenant les cellules HeLa ou les cellules T1 en culture et 0,9 ml de milieu de survie. Les tubes sont observés à 1 jour, 4 jours, 7 jours, 10 jours et 14 jours. Les modifications cellulaires sont notées en croix (+ : 25, ++ : 50, +++ : 75, ++++ : 100 p. 100). Les tubes sont changés au 7^e jour après la lecture à raison de 1 ml de milieu de survie. La lecture des tubes est faite au microscope à faible grossissement : 20 environ.

Deux lectures sont retenues : celle du 7^e jour et celle du 14^e jour. Nous exprimons les résultats par la dose infectante provoquant des lésions dans 50 p. 100 des tubes (DICT50), en utilisant la formule proposée par REED et MUENCH (1938 - 281). Dans quelques expériences nous avons calculé l'erreur sur la DICT50 selon la formule de PIZZI (1950 - 271).

Cette méthode de titrage est utilisée en virologie pour l'établissement des titres infectieux de suspensions virales préparées à partir de prototypes, l'isolement et l'identification de virus. Elle permet d'apprécier la quantité de virus intracellulaire ou extracellulaire, la quantité d'anticorps capables de neutraliser le virus.

2) Méthodes faisant intervenir la production d'un facteur soluble antigénique spécifique.

Nous avons utilisé la réaction de fixation du complément, semi-microméthode décrite par SOHIER et coll. (1956 - 312). Cette

technique fait intervenir la quantité de matériel soluble libérée au cours de la multiplication d'adénovirus, en présence d'anticorps appartenant au même groupe antigénique.

Pour faciliter l'expression et la comparaison de nos résultats, nous avons adopté la règle suivante : nous cherchons le titre moyen du sérum de référence en fonction des titres obtenus pour chaque dilution de la suspension virale, augmentée de la dilution de la suspension virale donnant encore une réaction positive lisible à la dilution 1/8 ou 1/16 du sérum de référence.

Cette réaction présente l'avantage d'être spécifique du groupe adénovirus, d'être facile à faire, reproductible et très couramment utilisée. Au laboratoire, cette technique est bien connue : elle permet d'apprécier la qualité des suspensions virales en présence de sérum contenant des anticorps à un titre donné. Elle est utilisée pour la recherche des anticorps de sujets soumis à une agression virale : adénovirus (SOHIER et coll., 1960 - 313), poliomyélite, herpès (SOHIER et coll., 1955 - 311), oreillons (recherche d'anticorps ourliens expérimentaux : CHARDONNET, 1958 - 47).

II. — MOYEN D'ETUDE DU COMPORTEMENT DE LA CELLULE AU COURS DE LA MULTIPLICATION ET DE L'EFFET TOXIQUE.

L'étude du comportement de la cellule au cours de son agression par l'adénovirus a pu se faire par des méthodes statiques et dynamiques.

A. — METHODES STATIQUES

Les moyens statiques comportent l'examen des cellules à un fort grossissement dans un état donné, soit en lumière ordinaire après fixation et coloration, soit en contraste de phase « *in vivo* ». Ces méthodes d'investigation nous donnent des renseignements soit sur la morphologie des cellules, soit sur la cytochimie.

1) Etudes morphologiques.

Toutes les cellules observées sont cultivées sur lamelles.

a) *Observations au microscope en lumière ordinaire à fort grossissement après coloration :*

Les colorations utilisées sont celles de GIEMSA (produit GEIGY), l'hématoxyline de REGAUD et la coloration à l'érythrosine — orange G — bleu de toluidine.

Pour la coloration par le GIEMSA, les cellules infectées ou non sont lavées à l'eau physiologique et séchées à l'air pendant 48 heures au moins. La dessiccation à l'air est la méthode qui nous a donné les meilleurs résultats.

Cette coloration permet d'apprécier les modifications importantes et globales de la cellule.

L'hématoxyline de REGAUD ne nous a pas apporté plus de renseignements, aussi a-t-elle été peu utilisée.

Pour la coloration à l'érythrosine — orange G — bleu de toluidine, les cultures infectées ou non sont lavées au sérum physiologique et fixées à l'alcool-acétique (9-1) pendant 90 minutes puis conservées dans l'alcool à 70°C jusqu'à coloration.

Cette technique a permis de préciser des détails morphologiques dus à l'agression virale et d'établir un cycle d'altérations.

b) *Observation au microscope à contraste de phase :*

Deux systèmes de contraste de phase ont été utilisés : le système à anneaux (type LEITZ) et le système interférentiel (type NOMARSKI).

L'examen des cellules se fait « in vivo » après montage spécial des lamelles portant les cultures sur lame porte-objet proposé par MULNARD *. Le montage consiste à poser la lamelle sur deux bandes de papier adhésif collées sur la lame porte-objet. Il permet aux cellules, d'être dans leur milieu et de les maintenir en bon état pendant 2 à 3 heures.

Nous avons pu observer au contraste de phase des cellules fixées à l'alcool-acétique.

2) **Etudes cytochimiques.**

Les cellules sont cultivées sur lamelles et fixées selon la réaction chimique mise en jeu.

Nous avons pu effectuer successivement des réactions sur les remaniements d'acides nucléiques, des réactions sur les protéines, les sucres et des réactions enzymatiques. Toutes les préparations sont examinées en lumière ordinaire à un grossissement 1.000 et en contraste de phase au microscope à anneaux.

a) *Etude des acides nucléiques :*

Les tests utilisés sont le test de FEULGEN et le test de BRACHET au vert-de-méthyle-pyronine contrôlé par l'action de la ribonucléase.

Les cultures cellulaires infectées ou non sont lavées avec du sérum physiologique et séchées à l'air ou fixées par l'alcool-acétique (9-1), le CARNOY (6-3-1), le formol neutralisé ou le BENSLEY (acide osmique à 2 p. 100).

Pour le test de FEULGEN, le temps d'hydrolyse est de 15 minutes lorsqu'il y a séchage à l'air, ou pour la fixation à l'alcool et 19 minutes pour la fixation osmiée. Le réactif de SCHIFF a été préparé soit selon COLEMAN (1949-51) soit selon LONGLEY (1952-221).

Le test de BRACHET est effectué sur cultures cellulaires séchées à l'air. La coloration est faite avec du vert-de-méthyle et de la pyronine GEIGY. Elle est contrôlée par la ribonucléase WORTHINGTON à 0,05 et 0,1 p. 100 dans l'eau distillée pendant 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures et 4 heures à 37°C et 0,01 p. 100 pendant 2 heures.

Selon LISON (1960-219) et PEARSE (1960-255), la réaction de FEULGEN et le test de BRACHET apparaissent comme les méthodes

* Communication personnelle.

de choix pour étudier la répartition et la localisation des acides nucléiques dans la cellule : réaction de FEULGEN pour les DNA et test de BRACHET pour les RNA. Cependant, il faut prendre quelques précautions pour que les colorations apparaissent spécifiques.

On sait que la réaction de FEULGEN peut être effectuée sur n'importe quel tissu, avec n'importe quel fixateur, excepté le BOVIN. Il est nécessaire de déterminer le temps d'hydrolyse selon le fixateur considéré. Il semble préférable d'utiliser le réactif de SCHIFF original à une leucofuchsine préparée selon d'autres procédés. De nombreux contrôles de la réaction par la désoxyribonucléase purifiée permettent de penser que la réaction est spécifique.

Le test de BRACHET repose sur la spécificité de la ribonucléase. Il n'est pas dans notre intention de discuter la valeur cytochimique de la détection des acides nucléiques par l'extraction à la ribonucléase. Nous avons tenu seulement à exécuter la réaction dans les conditions exactement superposables à celles qui sont pratiquées à l'Institut d'Embryologie de Bruxelles, de manière à placer notre travail, sinon à l'abri des critiques générales des méthodes, du moins à l'abri des critiques particulières à son exécution. (LISON, 1953 - 218).

La réaction colorée obtenue avec le vert de méthyle pour le DNA pourrait se manifester avec d'autres colorants, tels que le bleu de toluidine ou le vert malachite. La coloration n'apparaît pas spécifique, elle est utilisée à titre indicatif de la présence de DNA.

b) *Etude des protéines :*

Les protéines ont été identifiées en utilisant le groupe suivant de réactions citées par PEARSE (1960 - 255) :

— La réaction de MILLON pour la recherche de la tyrosine a été employée modifiée selon BENSLEY et GERSH (1933 - 255) et selon BAKER (1956 - 255). Les cellules sont fixées dans une solution de formol à 10 p. 100.

— La recherche de tryptophane a été effectuée par la méthode d'ADAMS (1957 - 255) au DMAB nitrite. La fixation des cellules est faite dans une solution saline de formol à 10 p. 100.

— L'étude des groupements aminés a été faite selon la méthode de YASUMA et ITCHIKAWA (1953 - 255) par désamination oxydative avec la ninhydrine et par la méthode de CHU (1953 - 255) et BURSTONE (1955 - 255) utilisant la chloramine T et le réactif de SCHIFF. Les cellules sont fixées au CARNOY pendant 90 minutes et conservées dans l'alcool à 70 c.

Nous savons que l'étude des protéines est difficile à faire en histochimie car les réactifs détruisent les cellules. Cependant quelques réactions peuvent s'appliquer aux coupes fixées (PEARSE, 1960 - 255). Nous avons choisi certaines méthodes proposées par PEARSE susceptibles d'apporter des renseignements dans l'étude de la cellule infectée.

c) *Etude des sucres :*

Plusieurs méthodes indiquées par PEARSE (1960 - 255), ont été

utilisées pour la localisation des sucres dans les cellules.

La réaction de MOLISCH modifiée par DIEZEL (1954 - 255) à l' α -naphthol donne une réaction rouge avec les composés contenant les hexoses.

La réaction de BRÜCKNER (1943 - 255) modifiée par DIEZEL (1954 - 255), à l'orcinol, donne des réactions avec les pentoses et les hexoses.

Le test de ROE et RICE (1948 - 255) modifié par DIEZEL (1954 - 255), à la bromoaniline donne des réactions positives avec les pentoses.

Pour toutes ces réactions, les cellules sont fixées au CARNOY.

Ces techniques cytologiques n'ont qu'une valeur indicative. Cependant, proposées par PEARSE (1960 - 255), elles présentent l'avantage d'apporter quelques informations sur la répartition des sucres au cours de l'infection virale.

d) *Etude enzymatique :*

Nous avons essayé d'étudier la répartition des lieux d'activité phosphatasique acide dans les cellules T1 en culture infectées ou non. Nous savons que certaines cellules sont riches en phosphatases acides et que cette activité serait liée aux lysosomes et aux mitochondries, éléments cytoplasmiques particulièrement importants dans le métabolisme cellulaire.

Deux méthodes ont été employées : la méthode de GOMORI (1941 - 146) adaptée par MULNARD* aux cultures cellulaires (méthode au nitrate de plomb) et la méthode aux sels de diazonium adaptée par GREEN et VERNEY (1956 - 152) aux cellules HeLa.

Pour la technique de GOMORI, la fixation est effectuée à + 4°C dans du sérum physiologique contenant 10 p. 100 de formol. Le substrat est constitué par une solution tampon à l'acétate à pH = 5 contenant 0,12 g p. 100 de nitrate de plomb et 0,3 g p. 100 de β -glycérophosphate de sodium.

Pour la technique aux sels de diazonium, la fixation a été faite par dessiccation à + 4°C ou dans du sérum physiologique contenant 10 p. 100 de formol à + 4°C. Le substrat est constitué par une solution tampon à l'acétate à pH = 5 contenant 0,03 g p. 100 de phosphate de benzyol-6-sodium.

Des blocages ont été réalisés par passage des préparations dans des solutions de fluorure de sodium 0,01M, de cyanure de potassium à 0,001M ou d'acide chlorhydrique 0,1N.

Dans chaque test, deux préparations sont introduites, l'une par incubation dans le substrat complet, l'autre sans substrat.

B. — METHODE DYNAMIQUE

En dehors de l'examen direct « in vivo » des cellules infectées

* Communication personnelle.

en contraste de phase, nous avons profité d'une installation micro-cinématographique permettant des enregistrements continus, mise au point au laboratoire (*).

Sans entrer dans les détails pratiques de la réalisation des enregistrements filmés, il nous paraît nécessaire cependant de préciser certains points.

Les cultures cellulaires ont été obtenues de deux façons : dans certaines expériences, elles ont été faites sur lamelles 12×32 mm et montées ensuite dans la chambre de ROBINEAUX avec perfusion continue ; dans d'autres expériences, les cellules sont cultivées sur lamelle 30×30 mm placée sur la chambre de CRUICKSHANK.

L'éclairage était réalisé par une lampe à filament de tungstène 6 volts, 5 ampères. Le filtrage de la lumière est obtenu par un filtre anticalorique (PETER, Lyon) et un filtre WRATTEN 60. L'illumination est coupée par une commande électronique entre chaque prise de vue et rétablie une demi-seconde avant le déclenchement de la caméra. Les intervalles de prise de vue ont varié de 1 seconde à 140 secondes. En général, nous avons utilisé un rythme de 1 à 2 images par minute pour les faibles grossissements (objectif 10) et des intervalles de 1 seconde entre les prises de vue effectuées à l'immersion.

Le maintien des cultures à température constante a été réalisé par l'emploi d'une platine chauffante modèle ZEISS et les écarts de température à l'intérieur de la platine ont été mesurés à la surface de la lame de verre portant la culture grâce à des thermomètres fabriqués spécialement pour la mesure de la température de la peau. Les variations de température n'excèdent pas un demi-degré par 24 heures.

Nous avons utilisé différentes sortes de pellicules : FERRANIA 28, films LUMIÈRE 16 mm ou KODAK Plus — X haute rapidité à grains fins.

Les films obtenus sont analysés selon les méthodes ordinaires de projection à la visionneuse ou sur écran. Les parties intéressantes sont découpées et soumises à l'examen par la méthode des calques proposée par FRÉDÉRIC (1958 - 123).

(*) Installation du Docteur PRUNIERAS réalisée avec l'aide du Centre des Grands Brûlés de l'Hôpital Saint-Luc (Lyon).

DEUXIÈME PARTIE

ETUDE DE LA MULTIPLICATION DU VIRUS DANS LA CELLULE PAR DES METHODES GLOBALES

Notre étude comporte l'utilisation de méthodes permettant d'apprécier directement la multiplication du virus et des méthodes mettant en évidence indirectement la présence du virus dans la cellule.

CHAPITRE PREMIER

RESULTATS ACQUIS AVEC DES METHODES DIRECTES

Dans ce chapitre nous rapporterons les résultats traduisant les variations quantitatives de DNA, RNA et protéines observées au cours de la multiplication du virus et nous discuterons les faits observés.

La microscopie électronique est une autre méthode permettant d'étudier directement la multiplication du virus. Cette question sera envisagée au cours de la troisième partie étudiant les réactions de la cellule soumise à l'agression virale.

I. — RESULTATS.

Nous rappelons brièvement les conditions de nos expériences.

Vingt cinq fioles de KOLLE de cellules HeLa sont infectées par une quantité connue d'adénovirus type 5 (0,3 DICT50 par cellule). Cinq autres boîtes constituent les témoins. Les délais de contact cellules-virus varient selon les fioles considérées : 2 heures, 8 heures, 24 heures, 48 heures et 72 heures. (Voir page 31 et les tableaux 1 à 5).

Les cellules sont détachées du verre puis séparées du milieu de culture par une centrifugation à faible vitesse. Les différentes fractions cellulaires et les milieux de culture sont soumis à une extraction des principaux éléments : nucléotides acidosolubles, phospholipides, acides ribonucléiques, acides désoxyribonucléiques et protéines, utilisant une technique adaptée aux cultures de cellules, inspirée des techniques classiques d'extraction (SCHMIDT et THANNHAUSER, 1945 - 303 ; SCHNEIDER, 1945 - 304 ; et OGUR et ROSEN, 1950 - 250).

A. — EXTRACTION DES MILIEUX DE CULTURE (SURNAGEANTS S)

Nous rapportons dans les tableaux 6 - 7 - 8 - 9 les résultats traduisant les variations des différents constituants biochimiques. Ils sont exprimés en unités pour les nucléotides acidosolubles par millilitre de milieu et en microgramme (μg) pour les RNA, DNA et protéines par millilitre de milieu.

1) Extraction des nucléotides acidosolubles.

Pour les nucléotides acidosolubles (voir tableau 6 et graphique 1) on note peu ou pas de différence entre les milieux de culture de cellules infectées ou non. On observe une diminution lente et progressive de 2 à 24 heures où se trouve atteint le minimum et une remontée à 48 et 72 heures.

Les calculs statistiques portant sur l'analyse de variance des moyennes obtenues pour chacun des délais de contact cellules-virus

montrent que la diminution observée entre 8 et 24 heures de contact est significative. De même les augmentations de nucléotides acidosolubles observées entre 24 et 48 heures puis entre 48 et 72 heures sont significatives.

Il y aurait donc prise en charge par les cellules des nucléotides du milieu de 2 à 24 heures puis une libération de 48 à 72 heures que les cellules soient infectées ou non.

2) Extraction des RNA.

Les RNA (voir tableau 7 et graphique 1) semblent être libérés dans le milieu au fur et à mesure que la population cellulaire s'accroît, pour les témoins.

Dans les milieux de culture infectés par le virus, on observe une quantité maximum de RNA après 24 heures de contact puis une diminution significative de 24 à 48 heures.

3) Extraction des DNA.

La quantité de DNA (voir tableau 8 et graphique 1) est très élevée dans les témoins après 2 ou 8 heures. On observe peu de différences entre les milieux de culture infectés ou non. Après infection on observe une diminution importante et significative entre 8 et 24 heures. Après 48 ou 72 heures on observe une augmentation significative de la quantité de DNA présente dans le milieu de culture des cellules infectées.

4) Extraction des protéines.

Pour les protéines, (voir tableau 9 et graphique 1) la quantité observée est voisine de 20 $\mu\text{g/ml}$ de milieu de culture de cellules non infectées. Les milieux de culture de cellules infectées contiennent une quantité de protéines inférieure. On observe une diminution significative du taux de protéines entre 8 et 24 heures. Le taux de protéines reste bas de 24 à 48 heures et remonte de manière significative à 72 heures.

B. — EXTRACTION DE LA FRACTION CELLULAIRE (HOMOGENEISAT H)

Les résultats en microgrammes (μg) de DNA, RNA ou protéines sont donnés par milligramme de tissu sec dans les tableaux 11 - 12 - 13. Pour les nucléotides acidosolubles, les résultats sont exprimés en unités par milligramme de tissu sec dans le tableau 10

1) Extraction des nucléotides acidosolubles.

Pour les nucléotides acidosolubles (voir tableau 10 et graphique 2) on observe peu ou pas de modification dans la quantité obtenue dans les cellules témoins et dans les cellules infectées. Cependant on remarque une tendance faible à voir les nucléotides acidosolubles augmenter dans les témoins et diminuer dans les cellules infectées. Les études statistiques mettant en œuvre l'analyse de covariance ne permettent pas de déceler de différences significatives.

Dosage de nucléotides acido-solubles dans les surnageants
Adénovirus type 5 -(lot 5-985)- cellules HeLa

Contact cellules-virus	Résultats	u/ml surnageant		ANALYSE DE VARIANCE					Signification
				Comparaison	F	Valeur F			
		Témoïn	Virus			P = 5 %	P = 1 %		
2 h	moyenne écart-type	4,08	3,68 + 0,5 _	2 h - 8 h	1	4,21	7,68	-	
8 h	moyenne écart-type	2,53	3,30 + 1,26 _	8 h - 24 h	64	4,21	7,68	+	
24 h	moyenne écart-type	2,82	2,77 ± 0,16	24 h - 48 h	28	4,21	7,68	+	
48 h	moyenne écart-type	4,65	3,29 ± 0,34	48 h - 72 h	206	4,21	7,68	+	
72 h	moyenne écart-type	5,02	5,36 ± 0,4						

TABLEAU 7

Dosage d'acides ribonucléiques dans les surnageants
Adénovirus type 5 (lot 5-985) - Cellules Hela

Contact cellules-virus	Résultats	µg/ml surnageant		ANALYSE DE VARIANCE					Signification
				Comparaison	F	Valeur F			
		Témoin	Virus			P = 5 %	P = 1 %		
2 h	moyenne écart-type								
8 h	moyenne écart-type	0,7	0,8 + 0,1	8 h - 24 h	4,8	4,26	7,82		+
24 h	moyenne écart-type	1,1	1,1 + 0,3	24 h - 48 h	10	4,26	7,82		+
48 h	moyenne écart-type	0,9	0,7 + 0,2	48 h - 72 h	< 0				-
72 h	moyenne écart-type	1	0,5 + 0,2						

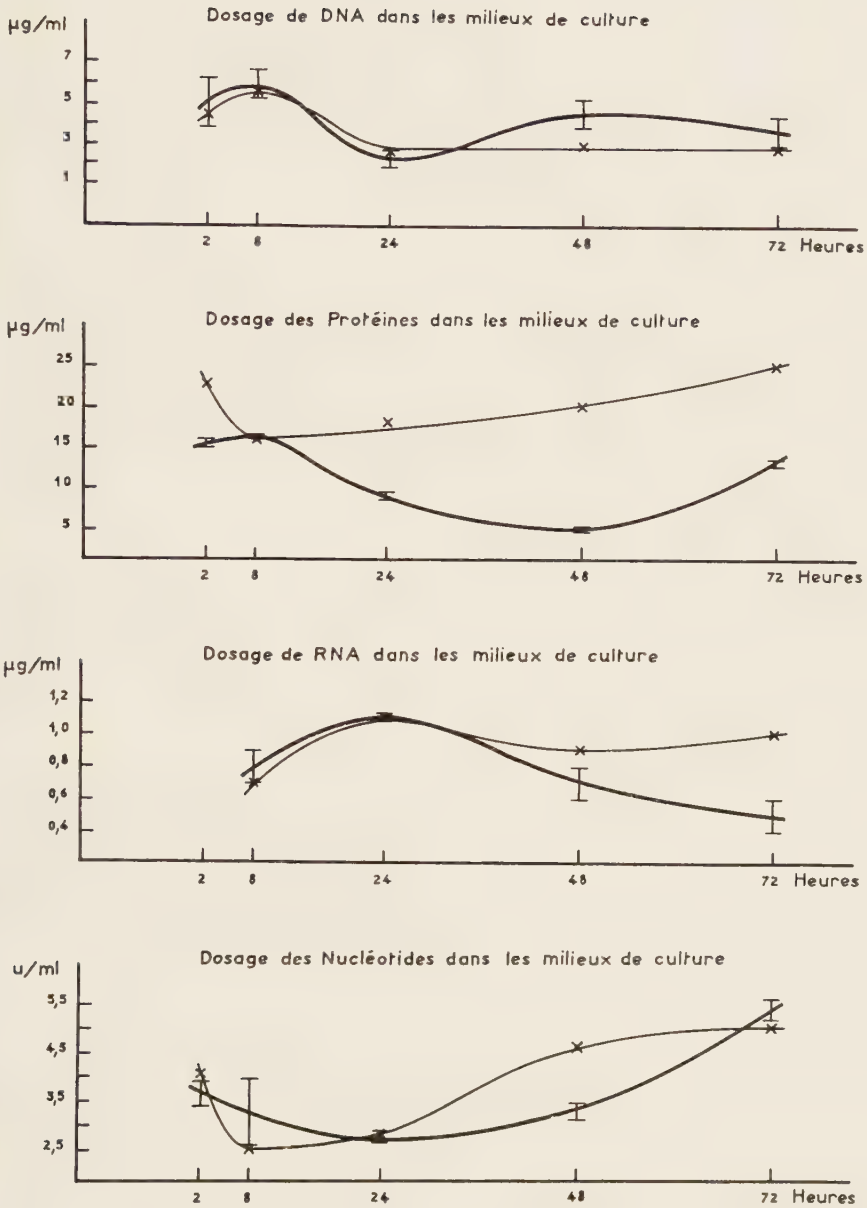
Dosage d'acides désoxyribonucléiques dans les surnageants
Adénovirus type 5 -(lot 5-985)- cellules HeLa

Contact cellules-virus	Résultats	µg/ml surnageant		ANALYSE DE VARIANCE					Signification
		Témoïn	Virus	Comparaison	F	Valeur F			
						P = 5 %	P = 1 %		
2 h	moyenne écart-type	4,4	5 ± 1,8						
8 h	moyenne écart-type	5,5	5,7 ± 1,7	8 h - 24 h 8 h - 48 h	49,1 4,8	4,22 4,20	7,72 7,64	+ +	
24 h	moyenne écart-type	2,65	2,27 ± 0,7	24 h - 48 h	15	5,32	11,26	+	
48 h	moyenne écart-type	4,5	4,60 ± 1,30						
72 h	moyenne écart-type	2,8	3,8 ± 1,3						

TABLEAU 9

Dosage des protéines dans les surnageants
Adénovirus type 5 (lot 5-985) - Cellules HeLa

Contact cellules-virus	Résultats	$\mu\text{g/ml}$ surnageant		ANALYSE DE VARIANCE					Signification
		Témoïn	Virus	Comparaison	F	Valeur F			
						P = 5 %	P = 1 %		
2 h	moyenne écart-type	23	15,5 ± 0,7	2 h - 8 h	0,07	249	6234		—
8 h	moyenne écart-type	14	16,2 ± 0,3	8 h - 24 h	8,8	4,38	8,18		+
24 h	moyenne écart-type	18,3	9 ± 0,5	24 h - 48 h	3,07	4,08	7,37		—
48 h	moyenne écart-type	20,3	5,5 ± 0,2	48 h - 72 h	13,6	4,45	8,40		+
72 h	moyenne écart-type	25	13,2 ± 0,5						



Graphique 1

Dosage des DNA, Protéines, RNA et Nucléotides
dans les milieux de culture

Virus —
Témoins ×—

2) Extraction des RNA.

Pour les RNA (voir tableau 11 et graphique 2) on note une quantité à peu près constante dans les cellules témoins. Une augmentation importante au niveau des cellules infectées a lieu entre 8 et 24 heures. Les analyses statistiques de covariance montrent qu'elle existe mais faiblement significative.

3) Extraction des DNA.

En ce qui concerne les DNA (voir tableau 12 et graphique 2) on observe une quantité à peu près constante dans les cellules témoins. On assiste à une augmentation progressive du taux de DNA dans les cellules infectées de 2 à 72 heures. Les études statistiques utilisant l'analyse de covariance mettent en évidence une augmentation significative du taux de DNA de 8 à 48 heures et 24 à 72 heures. Cette augmentation du taux de DNA à 48 et 72 heures pourrait correspondre à la multiplication des particules virales présentes dans les cellules.

4) Extraction des protéines.

Le taux de protéines (voir tableau 13 et graphique 2) présent dans les cellules non infectées paraît assez constant. Par contre, on observe au niveau des cellules infectées, une augmentation de 2 à 24 heures et une stabilité en plateau à partir de 24 heures. En fait, une différence significative n'apparaît qu'à partir de 48 heures.

II. — DISCUSSION.

Si de nombreux travaux ont eu lieu sur les Adénovirus, bien peu sont consacrés à l'étude des acides nucléiques par extraction. Il y a lieu de noter que deux groupes de méthodes différentes ont pu être utilisées : d'une part, l'extraction par les procédés brutaux permettant l'étude des variations quantitatives des DNA, RNA et protéines, lorsque les cellules sont soumises à une agression par adénovirus ; d'autre part, l'extraction par des procédés peu dénaturants pour l'obtention de DNA infectant.

A. — EXTRACTION PAR DES PROCEDES BRUTAUX

Dans ce premier groupe se trouvent les travaux de LEVY et coll. (1957 - 215), GINSBERG et coll. (1959 - 140 ; 1961 - 141), GINSBERG (1960 - 138), GREEN (1959 - 149), GREEN et DAESCH (1960 - 150 ; 1961 - 151).

Les difficultés d'extraction et de mesure des quantités d'acides nucléiques et de protéines cellulaires sont grandes. L'ensemble de nos résultats est rapporté dans les tableaux généraux 14 et 15.

Pour rapporter les mesures d'extraction à une *base de référence* trois possibilités nous étaient offertes :

- 1) le nombre de cellules ;
- 2) le poids humide de cellules en milligramme ;
- 3) le poids sec après extraction des phospholipides en milligramme.

Dosage des nucléotides acido-solubles dans la fraction cellulaire (Homogénéisats).
Adénovirus type 5 (lot 5-985) - Cellules HeLa

Contact cellules-virus	Résultats	U/mg tissu sec		ANALYSE DE COVARIANCE					Signification
				Comparaison	F	Valeur F			
		Témoïn	Virus			P = 5 %	P = 1 %		
2 h	moyenne écart-type	0,58	0,52 ± 0,09						
8 h	moyenne écart-type	0,68	0,62 ± 0,19	8 h - 24 h	1,8	4,41	8,28		—
24 h	moyenne écart-type	0,72	0,41 ± 0,24						
48 h	moyenne écart-type	0,82	0,52 ± 0,19						
72 h	moyenne écart-type	0,84	0,40 ± 0,13						

TABLEAU 11

Dosage d'acides ribonucléiques dans la fraction cellulaire (Homogénéisats).
Adénovirus type 5 (lot 5-985) - Cellules HeLa

ANALYSE DE COVARIANCE									
Contact cellules-virus	Résultats	µg/mg tissu sec		Comparaison	F	Valeur F		Signification	
		Témoïn	Virus			P = 5 %	P = 1 %		
2 h	moyenne écart-type								
8 h	moyenne écart-type	2,9	2,6 ± 0,8	8 h - 24 h	4,5	4,96	10,04	±	
24 h	moyenne écart-type	2,8	10,4 ± 5						
48 h	moyenne écart-type	2,3	3,6 ± 1,8						
72 h	moyenne écart-type	2,1	2,9 ± 0,7						

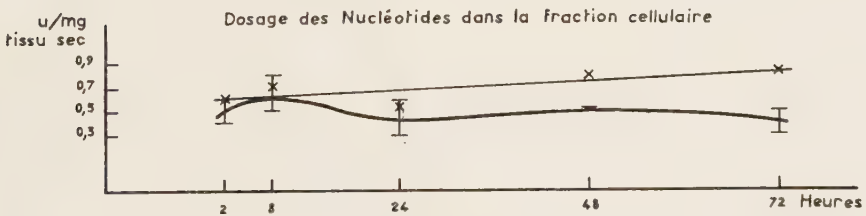
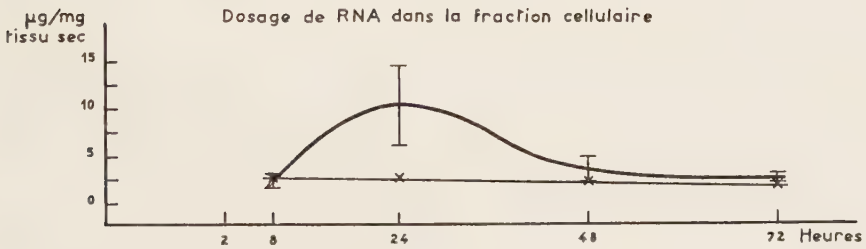
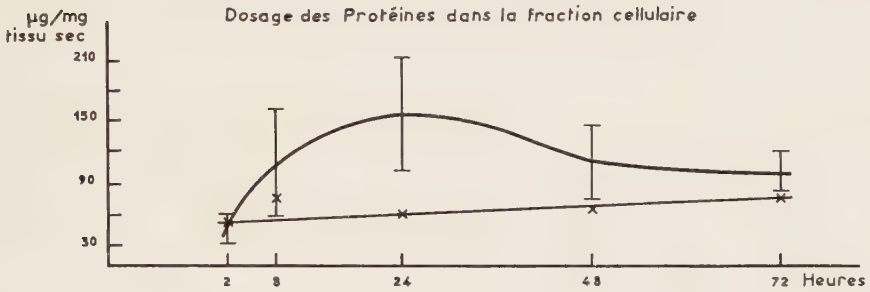
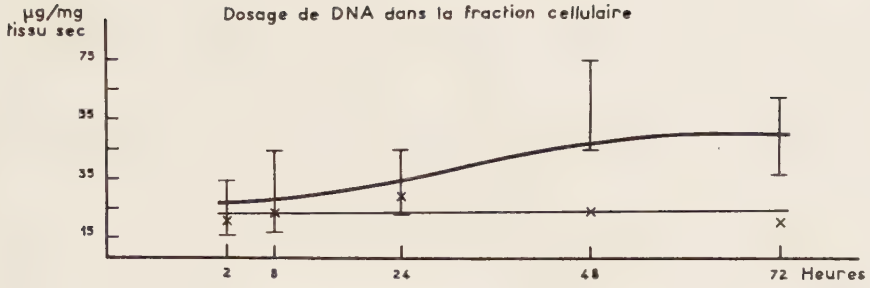
Dosage d'acides désoxyribonucléiques dans la fraction cellulaire (Homogénéisats).
Adénovirus type 5 (lot 5-985) - Cellules HeLa

Contact cellules-virus	Résultats	µg/mg tissu sec		ANALYSE DE COVARIANCE					Signification
		Témoïn	Virus	Comparaison	F	Valeur F			
						P = 5 %	P = 1 %		
2 h	moyenne écart-type	21,2	25,4 + 10,4						
8 h	moyenne écart-type	23,6	31 + 18	8 h - 24 h 8 h - 48 h	0,91 5,56	244 4,54	6106 8,66		- +
24 h	moyenne écart-type	29	34,5 + 17	24 h - 48 h	0,4	244	6106		-
48 h	moyenne écart-type	24,4	51,5 + 29	48 h - 72 h	0	245	6142		-
72 h	moyenne écart-type	25	49,9 + 17,1						

TABLEAU 13

Dosage des protéines de la fraction cellulaire (Homogénéisats).
Adénovirus type 5 (lot 5-985) - Cellules Hela

ANALYSE DE COVARIANCE									
Contact cellules-virus	Résultats	µg/mg tissu sec		Comparaison	F	Valeur F			Signification
		Témoïn	Virus			P = 5 %	P = 1 %		
2 h	moyenne écart-type	54,7	46,7 ± 15,2	2 h - 8 h 2 h - 24 h 2 h - 48 h	< 0 < 0 19		4,67	9,07	- - +
8 h	moyenne écart-type	57	124,7 ± 62,3	8 h - 48 h	1		4,54	8,68	-
24 h	moyenne écart-type	62 ± 33	159 ± 85	24 h - 48 h 24 h - 72 h	3 < 0		4,41	8,28	- -
48 h	moyenne écart-type	66,6	113,2 ± 46,4	48 h - 72 h	< 0				-
72 h	moyenne écart-type	78	105,3 ± 24,9						



Graphique 2

Dosage des DNA, Protéines, RNA et Nucléotides
dans la fraction cellulaire

Virus —

Témoins x—

Les travaux publiés antérieurement à notre étude prennent comme base de référence le nombre de cellules. Il nous était donc possible d'utiliser le même procédé.

L'avantage qu'il y aurait à prendre comme base de référence le poids humide n'apparaît pas étant données les faibles quantités de matériel proposé à l'extraction. Les erreurs sur le poids ne seraient pas inférieures à celles trouvées sur la numération.

Quant au poids sec, il est bien évident que le même reproche concernant la pesée peut être fait. Cependant on doit tenir compte du fait que l'extraction des acides nucléiques et des protéines a lieu directement après celle des phospholipides, donc sur un matériel sec. Or en prenant ce matériel sec comme base de référence, on a l'avantage d'éliminer les causes d'erreurs dues aux manipulations qui précèdent sa détermination (remise en suspension des cellules, pipetage, homogénéisation, mousse, etc...).

Il nous a paru intéressant en raison de ces considérations, d'étudier comparativement les trois bases de référence, tout en nous réservant de choisir celle qui apparaîtrait la plus stable pour l'établissement des calculs statistiques. En procédant de cette manière, nous avons ajouté à l'étude extractive quantitative proprement dite une étude critique des causes d'erreurs intervenant dans la procédure d'extraction.

L'examen des tableaux 6 à 13 fait apparaître des *écarts-types* inhabituellement observés correspondant jusqu'à une erreur de 30 p. 100.

Les écarts-types sont moins importants dans les résultats portant sur les milieux de culture que dans ceux portant sur la fraction cellulaire, probablement parce que la quantité de milieu introduite dans les boîtes est fixe, et importante, à savoir 30 ml. Pour les cellules, il faut remarquer que de nombreuses manipulations sont nécessaires pour l'extraction et les sources d'erreurs ont lieu à divers niveaux : détermination du poids humide de cellules conduisant au volume de solution physiologique à ajouter ; perte de matériel à l'issue du broyage à cause de la mousse inévitable malgré la capsule en téflon existant sur le type d'appareil employé.

Il nous est apparu nécessaire d'utiliser *l'analyse de variance* (Lison, 1958 - 218), pour l'étude des variations des nucléotides acidosolubles, DNA, RNA et protéines des milieux par rapport à l'unité de volume : le millilitre ; et *l'analyse de covariance* (Lison, 1958 - 218), pour l'étude des variations des nucléotides acidosolubles, DNA, RNA et protéines de la fraction cellulaire rapportées à l'unité de tissu sec : le milligramme, pour savoir si les variations observées étaient significatives. On remarque que les différences doivent être très importantes pour être significatives.

L'établissement des courbes étalons de DNA-RNA et protéines n'a pas présenté de difficultés.

Pour le DNA nous avons travaillé avec une solution fraîche (produits MERCK) entre 20 μg et 125 μg (20 - 30 - 50 - 75 et 125 μg). Les résultats obtenus montrent que les 5 points sont sur une droite. Le calcul de la déviation standard est effectué sur les 45 mesures correspondant à 50 μg . L'erreur commise est de 1,8 p. 100.

48 H	22	2,91 3,06	3,29	0,8 0,6	0,7	3,7	4,6	5 7	5,5
		3,78 3,69 3,99		0,5 0,5 0,3		6,1 3,8 5		6	
		3,06 3,30 3,24		0,9 1 0,8		6,6 3,3 4,1		5	
	24	3,06 2,70 3,30		0,9 0,7 0,4		3 2,4			
72 H	25 T	5,10 4,99 4,98	5,02	1 1,7	1,3	3,8 2,4 2,4	2,8	40 20 17	25
	26	5,79 5,76 5,61		0,4 0,4		4 3,7 3,5		18 20 17	13,2
	27	5,76 5,25 4,95		0,3 0,6		6,9 6,2 4,4		17 20 17	
	28	5,40 5,19 4,50	5,36	0,4 0,1 0,7	0,5	4,2 3,1 2	3,8	5 5 10	
	29	5,10 5,55 4,80		0,4 0,9 0,8		4,8 2,8 1,9		18 10	
	30	6 5,40		0,6 0,5 0,4		3,9 2,8 3		10 6	

T = Témoin, milieu de culture sans virus.

Pour tous les lots 1 à 30 : 3 prises d'essai de 1 ml.



Table d'énumération des résultats de l'extraction de la fraction cellulaire (Homogénéisats).

[illegible]

24 H (°)	14 T	11,400	274,8	6	0,2 0,7 0,4	0,48 0,54 0,54	0,41	10	34	120 125 67,5
	15	13,200	335,6	7,40	0,2 0,2 0,4	0,30 0,30 0,33	0,41	17,5	25 19 14	200 305 150
	16	15,900	281,5	5,75	0,1	0,48	0,41	5,6	11	34,5
	17	20,400	281,8	6,20	0,3 0,5	0,51 0,54	0,41	7,1	42 27	233,3 120
	18	13,900	226,1	5	0,7 0,5 0,3	0,48	0,41	17,3	58 32 36	174,2 170 106,7
48 H	19 T	10,800	233,3	5,15	0,9 0,9	0,83 0,80	0,82	3,6	28,9 20	77,7 55,5
	20	15,450	220	4,85	0,7	0,71	0,82	2,2	50	165,7
	21	11,700	232,9	5,15	0,9 0,9 2,1	0,75 0,75 0,37	0,82	1,4 3,8 1,7	40,9	77,7 211,1 87,1
	22	11,100	250,9	5,50	2	0,39	0,52	4,6	57	118,5
	23	9	229,1	5,05	2,9 2,4	0,29 0,32	0,52	6,2 2,3	43,4 51,7	81,7 83,3
72 H	24	8,550	258,8	5,70	2,1 1,1	0,40 0,66	0,52	4,6 6,2	70,5 47,3	112,8 80,9
	25 T	20,640	203,6	4,50	0,9 0,6	0,78 0,90	0,84	1,2 3,1	25	44,4 111,6
	26	10,350	273,1	6	0,5 2,5	0,469 0,388	0,84	3,8 2,5	26 50,4	159 93,3
	27	11,850	236,1	5,20	0,9 0,6	0,204	0,84	3,2 3,3	25 65,6	74 100
	28	15,150	214	4,70	1,3	0,38	0,40	1,7	53,8	104,6
159	29	18,900	239,2	5,25	1	0,69	0,40	3,5	63	107
	30	15	224	4,95	1,8 1,4 1,7	0,33 0,42 0,36	0,40	2,8 3,6 2,3	41,1 71,4 52,4	89,4 128,5 92,3

(°) Pour les lots 13 à 18, la prise d'essai est 0,5 ml, 3 prises d'essai par lot (délais de contact cellules-virus 24h).

Pour les autres lots, la prise d'essai est 1 ml (deux essais par lot).

T = Témoin : cellules sans virus.

Pour les *protéines* nous avons travaillé avec une solution fraîche de caséine (produit MERCK) dans NaOH N entre 10 et 100 μ g (10 - 20 - 50 - 70 et 100 μ g). Les résultats obtenus montrent que les 5 points sont alignés. Le calcul de la déviation standard est fait sur 60 mesures correspondant à 50 μ g. L'erreur est de 2,3 p. 100.

Nous avons effectué les *réactions colorées* à l'orceinol pour la détermination du pentose des RNA, à la diphénylamine pour la détermination de l'hexose des DNA et la réaction de FISKE et coll. (1925 - 113) pour la détermination du phosphore des RNA et des DNA. Les quantités nous ont paru extrêmement faibles et peu reproductibles d'une expérience à l'autre, au moins dans la fraction cellulaire.

Nous devons remarquer que dans l'établissement des courbes étalons de ribose, désoxypentose ou phosphore nous avons des erreurs assez faibles : 5,4, 5,4 et 4 p. 100.

Le fait que nous ayons travaillé sur de très petites quantités de tissu sec 0,750 mg à 1,500 mg explique probablement l'imprécision des résultats de ces tests colorés qui ne seraient pas employés pour l'établissement des tableaux et des courbes. Nous avons exprimé seulement les résultats provenant de mesures directes en lumière ultraviolette.

LEVY et coll. (1957 - 215) ont tenté de procéder à une extraction des acides nucléiques de cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 2. La détermination du DNA par la réaction de DISCHE à la diphénylamine avec le désoxypentose, et la détermination du RNA par le phloroglucinol avec le pentose, ne permettent pas d'apprécier les variations de DNA et de RNA.

Si la *manipulation* des milieux s'est révélée aisée en raison des quantités importantes dont nous disposions, il n'en fut pas de même pour la fraction cellulaire. Il fallait d'abord assurer une homogénéisation poussée. Celle-ci pratiquée à 45.000 tours/minute pendant 3 minutes, son contrôle microscopique s'est avéré satisfaisant.

Mais, nous avons pu remarquer que *numération et poids sec* des cellules ne sont pas obligatoirement parallèles. Il peut y avoir une augmentation de poids sec sans augmentation du nombre de cellules. Les erreurs commises sur les numérations sont comprises entre 5 et 10 p. 100.

Les erreurs commises sur le poids de tissu sec varient de 7 à 40 p. 100 d'une série d'homogénéisats à l'autre. Cependant nous observons une relation entre la quantité de substance dosée, RNA, DNA ou protéines, et le poids de tissu sec. Nous avons préféré le poids de tissu sec comme base de référence car il nous a permis de faire une étude statistique (analyse de covariance faisant intervenir 4 groupes de données).

Finalement, si nous exprimons nos résultats par million de cellules au lieu du poids sec, nous voyons qu'ils sont voisins de ceux rapportés par GINSBERG et coll. (1961 - 141) avec l'adénovirus type 5. Nos intervalles de confiance sont très proches de ceux de GREEN et coll. (1961 - 151). Or ces deux groupes de chercheurs ont employé le million de cellules comme référence et non le poids sec.

Nous avons utilisé l'acide perchlorique pour l'extraction des DNA et des RNA à des concentrations variables (10 p. 100 pour le DNA et 2 p. 100 pour le RNA) donnant une meilleure séparation DNA-RNA, l'un étant soluble à froid (+ 4°C pour le RNA) et l'autre étant soluble à chaud (90°C pour le DNA). Il semble que la perte en DNA et RNA soit faible.

GINSBERG et coll. (1959 - 140), GINSBERG (1960 - 138) travaillant avec l'adénovirus type 4 obtiennent une augmentation nette de DNA et de protéines. Leur extraction des acides nucléiques est faite par la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945 - 303). Les nucléotides sont analysés par chromatographie sur colonne de DOWEX. Les DNA sont déterminés par la réaction colorée à la diphénylamine, les RNA à l'orcinol et les protéines par la méthode de LOWRY (1951 - 225).

Les auteurs montrent que les cellules infectées contiennent deux sortes de DNA : le DNA soluble dans l'eau (qui appartient à la cellule-hôte), et le DNA soluble dans une solution saline de ClNa 0,15 M (qui appartient au virus et serait synthétisé « de novo »). Le caractère néoformé du DNA est d'ailleurs confirmé par DEFENDI (1960 - 65) avec la thymidine tritiée sur le virus GAL de la poule dont l'analogie avec les adénovirus a été mentionnée plus haut. Au cours de l'infection, seul le DNA soluble dans une solution saline de ClNa 0,15 M augmente.

De plus, par l'emploi de ^{32}P et ^{14}C , GINSBERG et coll. (1961 - 151) ont montré que le DNA provient d'un précurseur de la cellule ou du milieu et que sa synthèse commence 2 à 3 heures avant les particules de virus infectantes. On note une augmentation de la guanine dans le DNA nouvellement synthétisé. Avec l'adénovirus type 4, les RNA présentent une faible augmentation après infection de cellules mais n'ont pas de structure inhabituelle. Avec l'adénovirus type 5, GINSBERG et coll (1961 - 141) observent une augmentation nette de la quantité de RNA environ 24 heures après l'infection.

De son côté, GREEN, en 1959 (139), rapporte ses résultats sur cellules KB infectées par l'adénovirus type 2. Il observe une augmentation de ^{32}P dans les DNA, RNA et les mononucléotides. Il note peu ou pas de différence de radioactivité dans l'intervalle de zéro à 9 heures dans les témoins ou les cellules infectées. Entre 9 et 18 heures et entre 18 et 27 heures, la quantité de ^{32}P augmente dans les cellules infectées par le virus, tandis que pendant la période de 27 à 45 heures, l'incorporation diminue.

L'augmentation de ^{32}P est faible dans les RNA entre zéro et 9 heures ; elle s'accroît entre 9 et 18 heures, et entre 18 et 27 heures on note une diminution.

En 1960, GREEN et coll. (150) rapportent une augmentation de 20 à 50 p. 100 par cellule en 12 heures, 40 à 70 p. 100 en 24 heures et 60 à 100 p. 100 en 36 heures des DNA, RNA et protéines avec l'adénovirus type 2. L'incorporation de corps marqués est maximum à la moitié du temps de latence.

En 1961, GREEN et coll. (151) observent avec l'adénovirus type 2 une augmentation progressive du DNA et des protéines jusqu'à 36 heures. Les RNA augmentent à partir de 12 heures après l'in-

fection, atteignent leur maximum entre 24 et 36 heures puis diminuent au delà de 36 heures. Ceci semble dû à la lyse de la cellule et à la perte du RNA de la fraction cellulaire.

LEVY et coll. (1957 - 215) infectant des cellules HeLa avec l'adénovirus type 2 observent une modification rapide et prolongée de ^{32}P et de glycine $-2\text{-}^{14}\text{C}$ mais pas de modifications de P, RNA ou DNA. Cinq heures après l'infection, on observe une augmentation de ^{32}P dans toutes les fractions biochimiques sauf dans la fraction lipidique. La quantité de glycine $-2\text{-}^{14}\text{C}$ augmente seulement dans la fraction acidosoluble. Si les radioisotopes apparaissent très rapidement, on note une augmentation de la production d'acide lactique entre 8 et 24 heures après l'infection.

FISCHER et coll. (1957 - 12) ont cherché à identifier les acides produits au cours de la multiplication virale traduisant les troubles du métabolisme de la cellule-hôte. Outre l'acide lactique, les auteurs mettent en évidence la production d'acide pyruvique, acide acétique et acide α -cétoglutarique par des méthodes chromatographiques. Le glucose utilisé par les cellules infectées augmente en fonction de la quantité d'acide produit. Il y aurait donc une stimulation de la glycolyse. Il n'a pas été possible de démontrer que l'accumulation des acides carboxyliques et l'augmentation de la glycolyse font partie de la synthèse virale, elles accompagnent la synthèse virale.

Il ressort de l'ensemble des travaux effectués par GINSBERG et coll. (1959 - 140 ; 1961 - 141), GINSBERG (1960 - 138), GREEN (1959 - 149), GREEN et coll. (1960 - 150 ; 1961 - 151), qu'il existe une augmentation nette de la quantité de DNA et de protéines au cours de l'infection des cellules par adénovirus. Quant au RNA avec certains types tels que les adénovirus types 2 et 5, ces auteurs notent une augmentation significative plus précoce que l'augmentation de DNA, tandis qu'avec l'adénovirus type 4, l'augmentation de RNA est nettement plus faible.

Les modifications de synthèse du DNA décrites pour les adénovirus apparaissent particulières. Certes l'augmentation de DNA se retrouve dans les cellules infectées par d'autres virus tels que ceux de l'herpès (NEWTON et coll., 1958 - 247), de la vaccine (MAGEE et coll., 1959 - 228), de la rage (KAPLAN et coll., 1959 - 182) ou les virus d'encéphalites (MOORE et coll., 1958 - 234). L'adénovirus serait comparable au bactériophage T2 en ce sens que l'augmentation de DNA est détectable avant la production de particules infectantes.

Le mécanisme de reproduction de l'adénovirus est difficile à préciser. Comme pour les virus animaux, une partie seulement du poids des cellules infectées correspond au virus (environ 1 p. 100).

Les premiers résultats obtenus avec la fluorodésoxyuridine, par GREEN et coll. (1961 - 151), tendent à prouver que la synthèse de DNA est nécessaire à la production d'adénovirus.

FLANAGAN et coll. (1961 - 114 ; 1962 - 115) étudient la synthèse biochimique des adénovirus après infection de cellules HeLa traitées par la 5-FUDR (5-fluorodésoxyuridine). La synthèse de DNA essentielle à la production de virus commence 10 heures après l'infection et se poursuit jusqu'à 16 heures après l'infection. On peut penser que le DNA soluble dans une solution saline est un

précurseur des particules virales infectantes. Les études sur la production de matériel antigénique tendent à prouver que la formation de protéines spécifiques du virus dépendent directement de la synthèse du DNA.

TAMM et OSTERHOUT (1959 - 322) montrent que le 5-6-dichloro-1- β -d-ribofuranosylbenzimidazole (inhibiteur des RNA) inhibe également adénovirus et virus grippal B sur cellules de reins de singe. Ces résultats suggèrent que le RNA cellulaire joue un rôle dans la multiplication de certains virus qui contiennent des DNA.

B. — EXTRACTION PAR DES MOYENS PEU DENATURANTS

A côté de l'extraction de DNA par les procédés brutaux, se pose le problème d'extraction du DNA infectant par des moyens peu dénaturants.

Si l'on a isolé beaucoup de RNA à partir des virus à RNA tels que le virus poliomyélitique, le virus de Mengo, de l'encéphalite équine, West Nile, de l'encéphalomyélite de la souris, de la fièvre aphteuse, du virus grippal, du virus de la maladie de Newcastle et autres entre 1956 et 1961, peu d'essais positifs concernent les virus à DNA. Nous pouvons citer l'extraction de DNA biologiquement actif des phages, du polyome de la souris (DI MAYORCA, 1959 - 71), du virus vacuolant SV40 (GERBER, 1962 - 132). Pour les adénovirus, le seul travail venu à notre connaissance a été réalisé par PORTOCALA et coll, (1961 - 272). Ces chercheurs utilisant l'extraction au phénol réussissent à isoler à partir de la souche type 3, un DNA capable de provoquer des modifications spécifiques à des cellules amniotiques humaines en lignée continue ou à des cultures embryonnaires humaines. Un tel travail permettra dans l'avenir de faire une étude plus poussée du DNA viral comme l'indique FAURE (1959 - 116).

C. — RESUME

Nos résultats apparaissent très semblables à ceux des auteurs américains en ce qui concerne les procédés d'extraction brutale. Il nous permettent de mettre l'accent sur l'existence de variations quantitatives de RNA, DNA et protéines au cours de l'agression par l'adénovirus type 5. Trois pics significatifs sont obtenus : un pour les RNA, 24 heures après l'agression, un pour les DNA et un pour les protéines, 48 heures après l'infection.

Etant données les connaissances actuelles sur la synthèse des RNA, DNA et protéines cellulaires, il ne paraît pas sans intérêt de souligner que ces pics se succèdent dans le temps dans le sens général : RNA puis DNA en même temps que les protéines. La question se pose de savoir quel pourrait être le rôle éventuel des RNA.

Si l'on rapproche une telle séquence de l'analyse de notre étude cytologique telle qu'elle sera détaillée plus loin, il n'est pas impossible que cette expérience quantitative n'ait une certaine valeur pour l'interprétation des phénomènes réactionnels de la cellule soumise à l'agression de l'adénovirus type 5, et ne nous aide à construire une hypothèse de travail plausible pour de futures recherches.

CHAPITRE II

RESULTATS ACQUIS AVEC LES METHODES INDIRECTES

La multiplication du virus dans la cellule peut aussi être prouvée par des méthodes indirectes.

Ces méthodes ne consistent plus à caractériser le virus lui-même par la détermination visuelle de son existence propre au microscope électronique, ou par l'estimation de son constituant fondamental (DNA). Elles utilisent certaines propriétés du virus telles que le pouvoir infectieux ou la production de facteur soluble. Pouvoir infectieux et facteur soluble sont alors estimés non pas à l'échelle de la cellule mais à celle d'une population cellulaire. Il s'agit donc de méthodes indirectes et globales qui complètent en quelque sorte les méthodes cytologiques proprement dites, lesquelles ont en vue l'examen d'une ou de quelques cellules particulières et seront envisagées plus loin.

I. — RESULTATS.

A. — METHODES FAISANT INTERVENIR LES MODIFICATIONS CELLULAIRES MORPHOLOGIQUES

L'inoculation de suspension virale diluée à de nouvelles cultures cellulaires va permettre d'apprécier la sensibilité des cellules à l'agression virale et la cinétique de la multiplication des virus types 1 et 5. Les résultats sont exprimés par la DICT50 calculée selon la formule de REED et MUENCH (1938 - 281).

1) Etude de la sensibilité et de la réceptivité cellulaire à l'agression virale.

Nous avons pu étudier l'influence de la nature des cellules, l'influence du type de virus considéré et le rôle de la quantité de virus introduite.

a) *Influence de la nature des cellules :*

Les mêmes lots de virus type 1 (5-400), type 5 (5-126, 5-912), type 7 (5-117) et type 11 (5-129) ont été introduits en dilution sur des tubes de cultures de cellules HeLa, T1, reins de jeune lapin et cellules amniotiques humaines. Les résultats obtenus sont notés dans le tableau 16. Nous rapportons la moyenne des titres obtenus.

Nous avons procédé à des comparaisons de titres de virus obtenus sur cellules HeLa et cellules T1 pour les types 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, et 15. Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau 17.

Enfin nous avons voulu souligner la reproductibilité des 14 titres de virus obtenus sur un même type de cellules, les cellules

TABLEAU 16

Etude de la sensibilité des cellules à l'agression virale exprimée par le pouvoir infectieux DICT50.

ADENO- VIRUS Type	LOT	CELLULES HELA			CELLULES T 1			CELLULES DE REINS DE LAPIN			CELLULES AMNIOTIQUES HUMAINES		
		DICT 50 (°)		Nbre de ti- trages	DICT 50 (°)		Nbre de ti- trages	DICT 50 (°)		Nbre de ti- trage	DICT 50 (°)		Nbre de ti- trage
		7 j	14 j		7 j	10 j		7 j	14 j		10 j	18 j	
1	5 - 400	4,56	≥ 6,50	2	1,95	4,09	5	1,50	2,50	3	2,46	4,17	4
5	5 - 126	4,23	6,83	4	1,83	3,50	3	≤ 1	1,72	3	2	2,56	2
	5 - 912	5,50		2	4,33	6	3				3,83	5,50	2
7	5 - 117	1,16	2,50	2	0,83	2,36	3	0	0	1			
11	5 - 129	2,50	4,49	2				< 1	1,50	2	1,93	3,22	2

(°) Moyenne des DICT 50

TABLEAU 18

Reproductibilité de la réponse cellulaire à l'agression virale
(Adénovirus type 5 : lot 5-1491 - cellules T1)

DICT 50 7 j	ED50 (°) 7 j	DICT 50 10 j	ED50 (°) 10 j
1,50	0,28	3,50	0,28
1,83	0,38	5,16	0,38
1,50	0,28	2,50	0,28
2,50	0,28	3,37	0,31
2,50	0,28	3,50	0,28
1,50	0,28	3,50 ^	0,28
1,37	0,31	2,16	0,38
2,83	0,38	4,50	0,28
1,50	0,28	2,50	0,28
1,50	0,28	1,62	0,31
nd		2,37	0,31
1,50	0,28	2,50	0,28
1,50	0,28	2,83	0,38
1,50	0,28	3,50	0,28
1,50	0,28	3,50	0,28
1,50	0,28	2,50	0,28
m o y e n n e s			
1,73	0,29	3,09	0,32
(°) ED 50 : Erreur de PIZZI			

T1, avec l'adénovirus type 5 (lot 5-1491). Nous donnons dans le tableau 18 les titres trouvés, l'erreur ED50 sur la DICT50 calculée selon la formule de PIZZI (1950 - 290) après lecture à 7 et à 10 jours.

b) Influence du type de virus utilisé :

L'examen du tableau 17 montre que les titres de virus les plus élevés tant sur cellules HeLa que sur cellules T1, appartiennent aux types 1, 2, 5, 6, (< 4 sur cellules HeLa). Les titres compris entre 2,50 et 4 se retrouvent parmi les types 3, 5, 11 et 12. Les titres bas (< 2,50) correspondent aux types 4, 7 et 14 et les titres très bas (voisins de zéro) correspondent aux types de virus à dégénérescence très lente : 8, 9, 10, 13 et 15.

c) Rôle de la quantité de virus introduite :

Il existe une valeur optimum de la quantité de particules infectantes nécessaires pour se multiplier sur une quantité donnée de cellules. Il est apparu à diverses reprises que si l'on introduit une faible quantité de virus, on observe une dégénérescence cellulaire très lente, et le titre exprimant le pouvoir infectieux est très bas : $10^{-0,50}$ par 0,1 ml. De même si on introduit une très forte quantité de virus le titre de virus exprimant son pouvoir infectieux est très bas : voisin de $10^{-0,50}$, malgré une dégénérescence rapide. Cette constatation a pu être faite avec les types 1, 8, 9 et 10 essentiellement. C'est ainsi qu'avec le type 1 nous avons observés les faits suivants. Deux fioles de KOLLE de cellules HeLa sont inoculées, l'une K1 avec une faible dose de virus soit environ 6.000 DICT50 et une autre K2 avec une dose plus forte soit environ 23.000 DICT50 pour 10×10^6 cellules environ.

La première présente une dégénérescence d'apparence spécifique en 48 heures et la deuxième une dégénérescence non spécifique en moins de 24 heures. Les résultats obtenus en pouvoir infectieux sont indiqués dans le tableau 19.

TABLEAU 19

Cellules	Lots de virus	Délais de dégénérescence	DICT50	
			7 jours	14 jours
Kolle K1	5-781	48 h.	3,30	$\geq 5,50$
Kolle K2	5-783	24 h.	1,70	4,50

2) Cinétique de la multiplication de l'adénovirus type 1.

La production de virus capable de provoquer des lésions en fonction du temps d'incubation cellules-virus a pu être étudiée selon trois processus :

— d'abord l'appréciation de la teneur en virus du milieu recueilli après des contacts variables cellules-virus conservé congelé ;

— ensuite celle de la teneur en virus total produit, du milieu et des cellules conservés congelés ;

— enfin celle de la quantité de virus libéré chaque jour dans le milieu de culture conservé congelé.

Au moment de l'utilisation les liquides sont décongelés et centrifugés 3.000 tours/minute pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant constitue l'inoculat.

a) *Etude du virus extracellulaire libéré par les cellules après des délais de contact variables :*

Ces expériences ont été réalisées sur cellules T1 ou cellules de reins de jeune lapin infectées soit par le lot de virus 5-130 soit par le lot 5-400.

α — Cultures de cellules humaines en lignée continue T1.

Dans une première série de 2 expériences (25B et 77C) la suspension d'adénovirus type 1 (lot 5-130) a été introduite dans les tubes à lamelle à la dilution $10^{-1,39}$ à raison de 2 ml par tube (25 DICT50 pour une population cellulaire moyenne de 400.000). A chaque heure de prélèvement plusieurs tubes sont pris, les liquides sont recueillis, conservés séparément à -20°C et mélangés au moment de l'utilisation. Les délais de contact cellules-virus ont été : 9 - 24 - 33 - 48 - 57 - 72 - 81 - 96 - 105 - 120 - 129 heures.

Les résultats exprimant les DICT50 après la lecture du 7^{me} jour et celle du 14^e jour pour chacun des prélèvements sont donnés dans le tableau 20.

Dans une deuxième série de 10 expériences (77C, 87C, 93C, 10D, 26D, 36D, 3E, 42F, 52F et 65F) l'adénovirus type 1 (lot 5-400) a été introduit à la dilution 10^{-2} dans les tubes à lamelle à raison de 2 ml par tube (20 DICT50 pour une population moyenne de 400.000 cellules). Les heures de prélèvement ont été 9 - 24 - 33 - 48 - 57 - 72 - 81 - 96 - 105 - 120 - 129 - 144 - 168 - 192 - 200 - 216 - 240 - 259 heures. Dans quelques cas les prélèvements n'ont pu être effectués aux heures indiquées.

Dans ces expériences, les prélèvements portent sur 4 tubes à la fois. Les liquides sont recueillis séparément puis mélangés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Nous rapportons les résultats donnant les DICT50 de chaque prélèvement après lecture au 7^{me} et au 14^{me} jour dans le tableau 21. Les expériences 77C et 26D sont peu utilisables du fait que les prélèvements n'ont pu être effectués au delà de 129 heures.

β — Culture de cellules primaires de reins de lapin.

Deux expériences ont été faites sur cellules de reins de lapin : 46E et 63E. L'une (46E) comporte l'inoculation du lot de virus 5-400 à la dilution finale $10^{-1,39}$ à des tubes à lamelle à raison de 2 ml de cette dilution par tube (soit 70 DICT50 environ pour 800.000 cellules). L'autre (63E) comporte l'inoculation du lot d'adénovirus type 1 (lot 5-400) à la dilution $10^{-1,69}$ de tubes sans fond plat à raison de 1 ml par tube soit 20 DICT50 environ pour 400.000 cellules.

Réponse cellulaire à l'agression virale appréciée par le pouvoir infectieux DICT50.
(Deux expériences - Adénovirus type 1 : lot 5-130, 25 DICT50 sur cellules T1).

Prélèvement de plusieurs tubes.

D E L A I S C O N T A C T CELLULES - VIRUS		E X P E R I E N C E S N°			
		25 B		77 C	
		DICT 50 7 j	DICT 50 14 j	DICT 50 7 j	DICT 50 14 j
1 j	9 h	< 0	1,62		
	24 h	< 0	1,50		
	33 h	< 0	2,50		
2 j	48 h			0,50	4,16
	57 h			1,50	4,50
3 j	72 h	1,50	3,37	1,50	4,83
	81 h	< 0	3,37	2,37	4,37
4 j	96 h	0,33	4,16	1,50	4,83
	105 h	0,50	3,16	1,62	5,83
5 j	120 h	0,50	3,16		
	129 h			2,50	6,37

Réponse cellulaire à l'agression virale appréciée par le pouvoir infectieux DICT 50.
(Adénovirus type 1 : lot 5-400 sur cellules de reins de lapin - Prélèvement de 4 tubes examinés en mélange).

Inoculat :		20 DICT 50		70 DICT 50	
Expériences n°		46 E		63 E	
Délais Contact cellules-virus		DICT 7 j		DICT 14 j	
1 j	9 h	< 0		1,50	
	24 h	< 0		2,50	
	33 h	< 0		2,50	
2 j	48 h	0,50		2,50	
	56 h	< 0		2,50	
3 j	72 h	0,37		2,50	
	81 h	0,50		2,62	
4 j	96 h	0,50		3,00	
	105 h	0,50		3,50	
5 j	120 h	0,50		2,50	
	129 h	0,50		2,50	
6 j	144 h	0,62		3,62	
7 j	168 h	0,50		3,16	
	177 h	0,50		3,50	
8 j	192 h	0,50		3,50	
		< 0		2,37	
		< 0		2,62	
		< 0		2,62	
		0,50		3,37	
		0,37		3,37	
		< 0		2,50	
		< 0		3,37	
		0,50		3,83	
		0,50		3,50	
		0,50		3,50	
		0,50		3,50	
		0,37		2,62	

Les prélèvements sont effectués après des délais de contact de 9 - 24 - 33 - 48 - 56 - 72 - 81 - 96 - 105 - 120 - 129 - 144 - 168 - 177 et 192 heures.

A chaque prélèvement 4 tubes sont retirés dans l'expérience 46E et 3 dans l'expérience 63E. Les liquides sont mélangés et conservés à — 20°C jusqu'à utilisation.

Les résultats donnant les DICT50 de chaque prélèvement après lecture au 7^{me} et au 14^{me} jour sont donnés dans le tableau 22.

L'examen des 3 tableaux 20, 21, 22, montre que l'apparition du virus infectant a lieu tant sur cellules T1 que sur cellules de reins de lapin avant l'apparition des modifications cellulaires observées au faible grossissement.

Il est décelable dès 32 heures de contact cellules-virus après lecture du titrage au 7^{me} jour et 24 heures si la lecture du titrage est faite au 14^{me} jour.

L'appréciation du titre infectieux par l'observation des cellules inoculées pendant 7 jours seulement conduit à des erreurs par défaut, puisqu'elle pourrait laisser croire à l'absence de virus alors qu'en fait il y en a comme le prouve la lecture à 14 jours.

Le développement du virus paraît plus lent sur cellules de reins de lapin que sur cellules T1, les titres sont plus faibles.

Si on tente de faire une représentation graphique des résultats obtenus sur cellules T1 ou sur cellules de reins de lapin on s'aperçoit que les courbes traduisant la DICT50 (lecture à 7 jours) peuvent se ramener à 3 types :

Premier type de courbe présentant deux sommets séparés par un fossé où le titre infectieux est plus bas : le premier maximum se situe de 129 à 168 heures, le deuxième de 192 à 259 heures et le minimum vers 168 heures (voir graphique 3, expérience 25B).

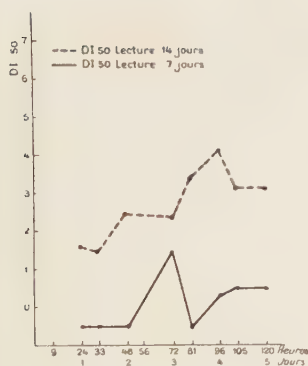
Deuxième type de courbe présentant deux sommets avec un minimum correspondant à une légère diminution de la quantité de virus présente : premier maximum de 56 à 168 heures et minimum de 72 à 168 heures (voir graphique 4, expérience 77C).

Troisième type de courbe présentant un plateau atteint à 72 heures (voir graphique 5, expérience 87C).

La lecture donnant la DICT50 à 14 jours apporte peu de modifications en ce sens que les mêmes types de courbes sont retrouvés. De plus si la différence obtenue entre le titre maximum et le titre minimum est assez importante (provenant de la lecture à 7 jours), nous retrouvons le même type de courbe : c'est le cas des expériences 36D et 93C. Si la différence n'est pas assez accentuée, la courbe a tendance à prendre l'allure du plateau (expériences 10D, 3E, 52F et 65F).

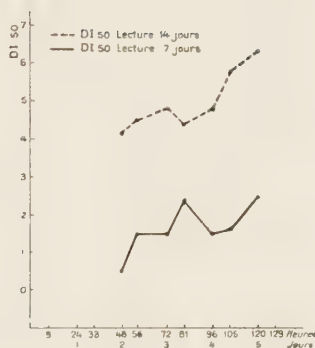
b) *Etude du virus total produit, intra et extra-cellulaire après des délais de contact variables :*

Cette étude comprend trois séries d'expériences (3G, 7G et 14G) réalisées sur cellules de rein humain en lignée continue T1. La suspension d'adénovirus type 1 (lot 5-670) est introduite dans les tubes 15×110 mm à la dilution $10^{-1,39}$ à raison de 1 ml par tube soit 13 DICT50 pour 100.000 cellules environ.

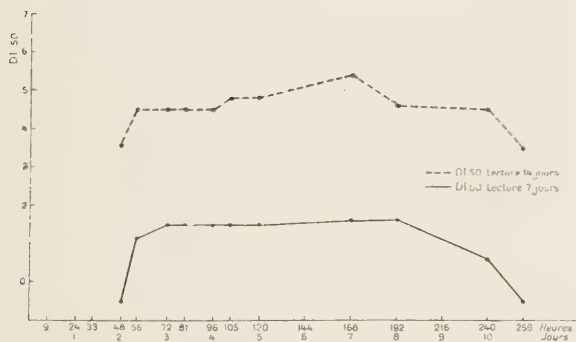


Graphique 3
(expérience 25 B)

Graphique 4
(expérience 77 C)



Graphique 5
(expérience 87 C)



TITRE INFECTIEUX

Fraction virale extracellulaire - Adénovirus type - Cellules T1

Les délais de contact cellules-virus sont les suivants : 24 - 48 - 72 - 96 - 120 - 144 - 168 - 192 heures.

Dans une première partie des expériences 3G, 7G et 14G les prélèvements portent sur 4 tubes, les cellules détachées de la paroi du tube par grattage avec une baguette de verre, tombent dans le milieu. Le milieu contenant les cellules est recueilli et conservé à -20°C jusqu'à utilisation. A ce moment il est décongelé et soumis à 3 congélations à -40°C et décongelations sous l'eau du robinet ; il est ensuite centrifugé à 3.000 tours/minute pendant 10 minutes ; le surnageant recueilli constitue l'inoculat. Dans ce cas nous cherchons la quantité totale de virus produite : celle contenue dans les cellules et celle libérée dans le milieu.

c) Etude du virus libéré dans le milieu de culture chaque jour :

Dans une deuxième partie des expériences 7G et 14G la suspension de virus est laissée en contact avec les cellules pendant 2 et 4 heures, le milieu est recueilli et conservé à -20°C ; il est remplacé par 1 ml de milieu neuf dans chaque tube, les cellules sont mises en incubation à 35°C et les prélèvements ont lieu aux heures indiquées ci-dessus. Chaque fois le milieu est retiré de chaque tube, conservé à -20°C et remplacé par du milieu neuf, c'est le lavage des cellules. Dans ce cas nous titrons la quantité de virus libérée dans le milieu chaque jour par les cellules.

Les résultats traduisant les DICT50 des liquides recueillis après des délais de contact cellules-virus variables (virus total, intra et extracellulaire, et virus libéré chaque jour) après lecture à 7 et à 10 jours sont résumés dans le tableau 23 et les graphiques 6 et 7.

Il ressort de cette étude qu'il y a une différence importante entre la quantité de virus totale produite et la quantité de virus libérée chaque jour. Le virus présent dans les milieux de lavage quotidien n'est décelable qu'à partir du 5^e ou 6^e jour alors qu'il est décelable en 2 à 3 jours dans les cultures où nous avons procédé au grattage.

Les courbes traduisant l'apparition et l'évolution de la fraction infectante dans les milieux avec grattage des cellules sont du même type que celles précédemment décrites :

Si la lecture des titrages est à 7 jours, les courbes des expériences 3G, 7G et 14G appartiennent au 3^e type.

Si la lecture des titrages est à 14 jours, les courbes 3G et 14G appartiennent au 3^e type et 7G au 2^e type.

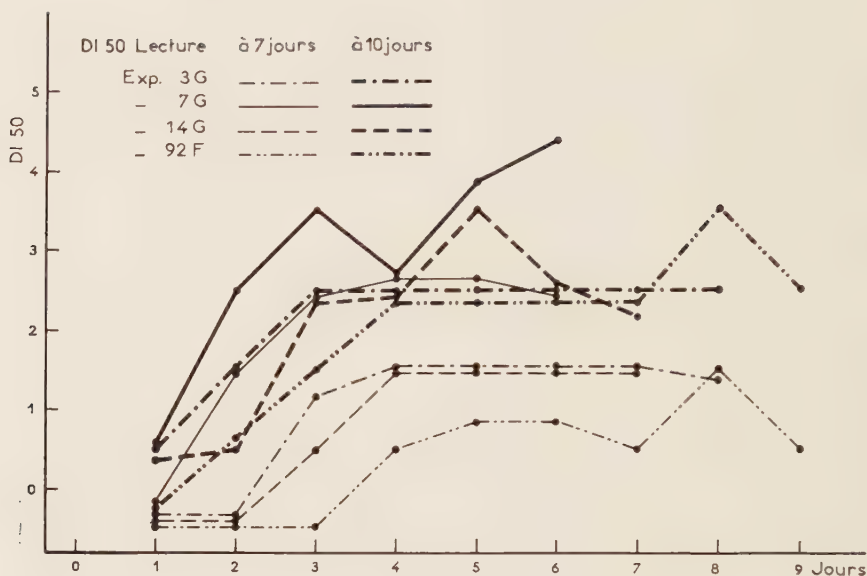
Les milieux de lavages permettent de tracer des courbes très différentes, il y a une augmentation progressive de la quantité de virus produite et libérée (voir graphique 7).

Au cours de ces expériences nous avons pu montrer l'influence de la quantité de virus introduite dans les tubes de culture. Le lot de virus 5-670 a été introduit à la dilution $10^{-2,80}$ dans des cultures de cellules T1 (92F) en tubes 15×110 mm à raison de 1 ml par tube (soit 1,6 DICT50 pour 100.000 cellules). Les cellules ont été

Cinétique de la réponse cellulaire à l'agression virale exprimée par le pouvoir infectieux Dict 50.
(Adénovirus type 1 : lot 5-670 - Cellules T1)

Exp n° ↓ contact cellules-virus	Inoculat : 13 DICT 50 GRATTAGE						1,6 DICT 50 GRATTAGE		13 DICT 50 LAVAGE			
	3 G		7 G		14 G		92 F		7 G		14 G	
	DICT 50		DICT 50		DICT 50		DICT 50		DICT 50		DICT 50	
	7 j	10 j	7 j	10 j	7 j	10 j	7 j	10 j	7 j	10 j	7 j	10 j
0 j												
1 j	nd	0,50	nd	0,50	nd	0,37	nd	nd	nd	nd	nd	0,50
2 j	nd	1,50	1,50	2,50	nd	0,50	nd	0,62	nd	nd	nd	nd
3 j	1,16	2,50	2,50	3,50	0,50	2,50	nd	1,50	nd	nd	nd	0,33
4 j	1,50	2,50	2,62	2,62	1,50	2,50	0,50	2,50	nd	0,50	nd	0,50
5 j	1,50	2,50	2,62	3,83	1,50	3,50	0,83	2,50	nd	0,50	0,50	1,50
6 j	1,50	2,50	2,50	4,37	1,50	2,50	0,83	2,50	0,50	1,50	0,50	1,62
7 j	1,50	2,50			1,50	2,16	0,50	2,50	0,50	1,50	1,50	2,50
8 j	1,37	2,50					1,50	3,50	1,50	2,50	2,50	3,50
9 j							0,50	2,50	2,50	3,50		

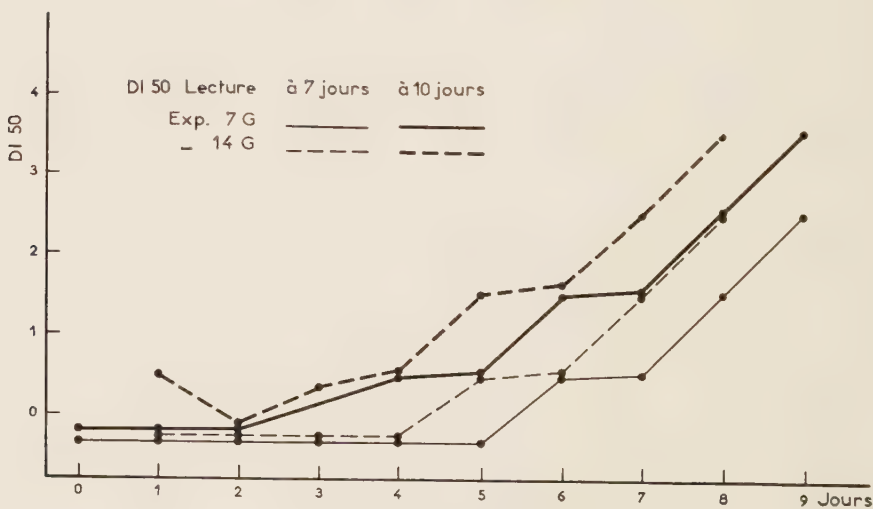
nd = non dégénéré



Graphique 6

TITRE INFECTIEUX

Fraction virale intra et extracellulaire
Adénovirus type 1 - Cellules T1



Graphique 7

TITRE INFECTIEUX

Fraction virale extracellulaire = Lavage quotidien
Adénovirus type 1 - Cellules T1

détachées du tube par grattage, les milieux des tubes ont été retirés, mélangés et conservés à -20°C et soumis au même traitement que celui précédemment décrit. Les résultats donnant les DICT50 des milieux sont exprimés dans le tableau 23 et le graphique 6. Il apparaît que la production de virus est retardée par rapport aux expériences 3G, 7G ou 14G : l'apparition de virus infectant a lieu au 4^e jour et les titres des milieux recueillis du 5^e au 8^e jour sont plus faibles.

3) Cinétique de la production d'adénovirus type 5.

Nous avons étudié la production de particules virales infectantes par les cellules HeLa inoculée avec l'adénovirus type 5, après des délais variables d'incubation cellules-virus : 2, 8, 24, 48 et 72 heures.

Les cellules HeLa sontensemencées dans des fioles de KOLLE à raison de 5×10^6 cellules pour 30 ml de milieu de croissance et placées 4 jours à 35°C . Le milieu de croissance est remplacé par 30 ml de milieu de survie et 0,3 ml de suspension de virus (lot 5-985) soit 3×10^6 DICT50 pour 10^7 cellules.

Après les délais d'incubation indiqués les cellules sont détachées du verre. Le milieu contenant les cellules est centrifugé à 3.000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant et le culot de cellules sont séparés. Le culot de cellules est lavé et remis en suspension dans du sérum physiologique à raison de 22 ml par gramme de poids humide de cellules. Surnageants et culots sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation. A ce moment la suspension cellulaire est soumise à un cycle de 3 congélations et décongélations puis centrifugée à 3.000 tours/minute pendant 10 minutes ; le liquide surnageant les débris cellulaires est utilisé dans le titrage.

L'étude de la production de virus a lieu dans la fraction cellulaire et dans le milieu ambiant.

Nous rapportons les résultats donnant les DICT50 de chaque prélèvement après lecture au 7^e et au 14^e jour dans le tableau 24 et le graphique 8.

4) Résumé.

L'étude de la production du matériel infectant capable de provoquer les lésions cellulaires typiques par passages successifs permet de dégager les faits suivants :

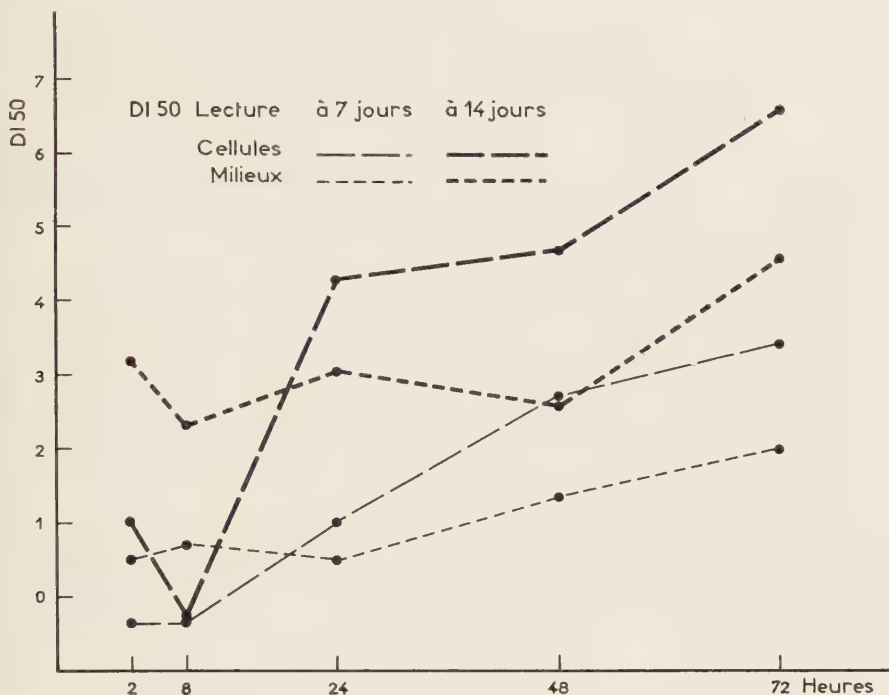
a) Une étude générale des adénovirus types 1 à 17 montre que les titres infectieux exprimant la production de virus sur différentes cellules varient selon les cellules : les titres les plus élevés sont obtenus sur cellules HeLa puis sur cellules T1 et cellules amniotiques, enfin sur cellules de reins de lapin. Le même lot de virus type 5 utilisé comme référence sur cellules T1 a montré une bonne reproductibilité de son titre : DICT50 à 7 jours = $10^{1,73}$ et à 10 jours = $10^{-3,09}$.

Certaines types de virus produisent des lésions cellulaires accompagnées d'une chute des cellules altérées en 2 à 3 jours : types 1, 2, 5, 6 avec des titres infectieux > 4 sur cellules HeLa.

Cinétique de la réponse cellulaire à l'agression virale exprimée par le pouvoir infectieux DICT 50.
(Cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5).

CONTACT CELLULES-VIRUS	V I R U S										TEMOINS	
	SURNAGEANTS					HOMOGENEISATS					SURNA - GEANT 7 ou 14 j	HOMOGÉ - NEISAT 7 ou 14 j
	DICT 50 7 j	DICT 50 7 j moyenne	DICT 50 14 j	DICT 50 14 j moyenne	DICT 50 7 j	DICT 50 7 j moyenne	DICT 50 14 j	DICT 50 14 j moyenne	DICT 50 14 j	DICT 50 14 j moyenne		
2 h	0,50		3,50		nd		1,20					
	0,50		3,50		nd		0,83					
	0,50		2,62		nd		0,83					
	0,50	0,50	3,83	3,21	nd	nd	1,50	1,03			nd	
	0,50		2,62		nd		0,83					
8 h	0,50		2,50		nd		nd					
	0,50		1,50		nd		nd					
	1,50	0,70	2,50	2,32	nd	nd	nd	nd			nd	
	0,50		2,62		nd		nd					
	0,50		2,50		nd		nd					
24 h	0,50		3,50		1,50		4,50					
	0,50		3,37		0,50		3,50					
	0,50	0,50	2,83	3,06	-	1,05	-	4,28			nd	
	0,50		2,62		0,83		4,50					
	0,50		3		1,37		4,62					
48 h	1,50		2,62		2,62		-					
	1,50		2,83		2,50		5,37					
	1,50	1,36	2,50	2,59	2,50	2,72	3,50	4,68			nd	
	1,50		2,50		3,50		5,16					
	0,83		2,50		2,50		4,70					
72 h	-		4,37		3,83		7,50					
	2,50		4,75		3,50		6,83					
	2,50	2	5,31	4,59	3,50	3,43	6,62	6,61			nd	
	1,50		4,37		2,50		5,62					
	1,50		4,16		3,83		6,50					

nd = non dégénéré



Graphique 8

TITRE INFECTIEUX

Fraction virale intracellulaire et extracellulaire
Adénovirus type 5 - Cellules HeLa

D'autres sont plus lents avec une dégénérescence en 3 à 5 jours : type 3, 11 et 12 et des titres infectieux compris entre 2,50 et 4. D'autres types de virus provoquent une dégénérescence en 5 à 7 jours et leur titre est voisin de 1,50 à 2 tels que les types 4 et 7. Enfin, certains types de virus provoquent une dégénérescence en 6 à 8 et même 10 jours, types 8, 9, 10, 13 et 15 et les titres infectieux sont très bas, voisins de zéro.

Enfin on remarque qu'une dégénérescence très rapide peut survenir accompagnée d'une chute des cellules en 24 à 48 heures. Le titre infectieux de la suspension est alors faible ou nul, ce qui conduit à admettre que les cellules subissent une altération due à un phénomène du type « effet toxique » sans multiplication du virus.

b) Une étude particulière concerne la cinétique de la production du matériel infectant de l'adénovirus type 1 sur cellules T1 et sur cellules de reins de lapin, en recueillant le milieu dans lequel baignent les cellules entre 9 et 259 heures. Ce milieu conservé congelé est centrifugé au moment de l'utilisation. Il apparaît que la courbe traduisant la production de particules infectantes peut présenter 2 allures différentes :

— *Premier type de courbe* présentant deux sommets et un minimum pouvant être plus ou moins important.

— *Deuxième type de courbe* augmentant progressivement avec un plateau.

Lorsque le milieu et les cellules sont recueillis, conservés congelés et soumis à un cycle de 3 congélations et décongélations successives, on titre le virus total intra et extracellulaire. Les 2 types de courbes se retrouvent.

Lorsqu'on recueille le milieu mis chaque jour sur les cellules infectées, on a le virus extracellulaire libéré chaque jour, la courbe obtenue est du deuxième type. L'apparition des particules infectantes est retardée, elle a lieu vers le 5^{me} ou le 6^{me} jour.

c) Une autre étude concerne la cinétique de la production par les cellules HeLa des particules infectantes de l'adénovirus type 5. A chaque prélèvement le surnageant est séparé des cellules, de sorte que le titrage du pouvoir infectieux porte sur la production de virus intracellulaire et extracellulaire.

Les surnageants ont des titres très faibles même dans les premiers prélèvements 2 et 8 heures alors que dans les cellules soumises à un cycle de congélations et décongélations successives on observe déjà une production de virus à 24 heures et un titre élevé à 72 heures.

B. — METHODES FAISANT APPARAÎTRE LA PRODUCTION D'UN FACTEUR SOLUBLE

Ce sont les méthodes qui mettent les suspensions virales contenant le facteur soluble en présence de quantités connues d'anticorps présents dans le sérum de sujets ayant eu une affection à adénovirus dans les réactions dites réactions de fixation du complément.

1) Etude de la sensibilité et de la réceptivité cellulaire à l'agression virale.

Nous avons pu observer que les cellules HeLa, T1 ou cellules rénales de lapin infectées par les adénovirus types 1 et 5 sont capables de produire une fraction soluble décelable par cette réaction de fixation du complément.

a) Influence de la nature des cellules :

Il apparaît que les cellules HeLa donnent une production régulière de la substance soluble en des délais variant de 2 à 6 jours. Les cellules T1 ont un mode de dégénérescence plus long, les titres traduisant le facteur soluble sont plus bas et les liquides recueillis sont souvent anticomplémentaires (*). Les cellules de reins de jeune lapin donnent des titres bas.

(*) On dit qu'un liquide est anticomplémentaire quand il a la propriété d'empêcher l'activité du complément dans la réaction de fixation du complément. C'est un phénomène de nature inconnue se traduisant par un défaut d'hémolyse.

b) Influence du type de virus utilisé :

Nous avons réalisé une étude sur cellules HeLa infectées par les prototypes 1 à 16 d'adénovirus.

Nous rapportons dans le tableau 25 les résultats obtenus pour les 22 lots de virus préparés.

Il ressort de cette étude que tous les types d'adénovirus infectant des cellules HeLa sont capables de produire le même facteur soluble intervenant dans la réaction de fixation du complément. Tous les lots de virus provenant d'une dégénérescence lente ont des titres faibles et sont souvent anticomplémentaires.

c) Rôle de la quantité de virus introduite :

La même remarque que pour le pouvoir infectieux s'impose. Nous avons pu observer, avec les types 1, 8, 9, 10, qu'il existe une quantité optimum de virus à introduire sur les cellules pour obtenir un haut titre de la fraction soluble.

Nous rapportons les faits constatés avec l'adénovirus type 1. Les deux fioles de KOLLE de cellules HeLa inoculées, l'une K1, avec une faible dose de virus et l'autre K2, avec une forte dose de virus, ont donné les résultats suivants dans le tableau 26.

TABLEAU 26

Cellules	Lots de virus	Délai de dégénérescence	fraction soluble * Titre de la
Kolle K1	5-781	48 h.	11,60
Kolle K2	5-783	24 h.	9,85

(*) Titre de la fraction soluble exprimé selon la règle énoncée page 37.

La production de facteur soluble est nettement diminuée lorsque la dégénérescence est trop rapide.

2) Cinétique de la production de facteur soluble dans les cellules infectées par l'adénovirus type 1.

La production de facteur soluble dans les cellules infectées en fonction du temps d'incubation cellules-virus a pu être étudiée selon les 3 processus décrits pour l'étude du pouvoir infectieux.

— d'abord une appréciation de la teneur en virus du milieu recueilli après des contacts variables cellules-virus ;

— ensuite celle de la teneur en virus total produit, du milieu et des cellules ;

— enfin la quantité de virus libéré chaque jour dans le milieu de culture.

TABLEAU 25

Réponse cellulaire à l'agression virale appréciée par la production de facteur soluble selon les types d'adénovirus sur cellules HeLa.

Types	N° Lot	Titre (°)	Remarque	Délai dégéné- rescence
1	5-1403	8,75		4 j
	5-1488	10,25		
	5-1565	≥ 11,50		
2	5-1405	7,63		3 j
3	5-1511	5,50		
	5-1517	8,75		5 j
4	5-1407	≥ 11	Ac	4 j
5	5-1406	7	Ac	2 j
	5-1491	5,66	Ac	4 j
6	5-1549	≥ 8,75		3 j
7	5-1490	≥ 8	Ac	
	5-1498	7		7 j
8	5-1560	< 3		5 j
9	5-1559	7	Ac	4 j
10	5-1558	7,33		4 j
11	5-1518	≥ 8,75		4 j
	5-1557	5,50		2 j
12	5-1547	10,66		2 j
13	5-1566	7,66	Ac	4 j
14	5-1555	8,25		6 j
15	5-1546	8	Ac	4 j
16	5-1567	8,25	Ac	

Ac : anti complémentaire

(°) Titre de la fraction soluble exprimé selon la règle énoncée p.37

Les liquides conservés congelés, sont décongelés au moment de l'emploi et centrifugés à 3.000 tours/minute pendant 10 minutes, pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est utilisé dans la réaction permettant de détecter la fraction soluble.

a) *Etude du virus extracellulaire libéré par les cellules après des délais de contact variables :*

Cette étude comporte 27 expériences dont certaines se retrouvent dans l'étude du pouvoir infectieux. La production de facteur soluble a été étudiée sur cellules de rein humain T1 ou sur cellules de reins de jeune lapin infectées soit par le lot 5-130 soit par le lot 5-400.

α — Cultures de cellules humaines en lignée continue T1.

Dans *une première série de 8 expériences*, l'adénovirus type 1 (lot 5-130) a été introduit à la dilution $10^{-1,39}$ dans les tubes à lamelles (25 DICT50 pour une population moyenne de 400.000 cellules) ; les prélèvements ont été effectués à raison d'un seul tube aux délais indiqués dans le tableau 27 ; les liquides recueillis ont été congelés et utilisés non dilués dans la réaction mettant en évidence la présence du facteur soluble.

Nous rapportons dans le tableau 27 les résultats pour chacune des 8 expériences en exprimant le titre du sérum de référence en présence de chacun des liquides prélevés par le logarithme du dénominateur de la fraction en base 2.

Il ressort de ce tableau que l'apparition du facteur soluble a lieu en des temps variables : 42 heures dans 1 cas sur 6 étudiés ; 48 heures dans 2 cas sur 6, 66 heures dans 2 cas sur 6 et 72 heures dans 1 cas sur 6. A 72 heures la production de la fraction soluble a toujours eu lieu.

Le titre du sérum de référence en présence des liquides prélevés entre 72 et 120 heures reste élevé ; il est un peu plus bas (2 unités) lorsque le prélèvement est fait à 168 heures ; il reste le même jusqu'à 216 heures.

Dans *une deuxième série de 3 expériences* nous avons employé le même lot de virus type 1 (lot 5-130) à la dilution $10^{-1,39}$ (25 DICT50 pour 400.000 cellules environ) mais chaque prélèvement comportait 3 à 5 tubes. Les liquides recueillis ont été congelés séparément et utilisés non dilués et isolément dans une première réaction décelant la fraction soluble. Au cours d'une seconde réaction, les liquides restants correspondant aux tubes d'un même prélèvement ont été mélangés à volume égal, et le mélange constituait la suspension virale dans laquelle nous recherchons la présence du facteur soluble.

Le tableau 28 rapporte les titres du sérum de référence en présence soit des liquides provenant d'un seul tube soit du mélange des liquides provenant des tubes prélevés au même moment.

Nous constatons que l'apparition de la fraction soluble a lieu à 72 heures dans les 3 cas.

L'examen du titre du sérum de référence obtenu avec les prélèvements de tubes isolés ou en mélange montre quelques dif-

TABLEAU 27

Réponse cellulaire à l'agression virale
appréciée par la production de facteur soluble.

(Première série : 8 expériences. Adénovirus type 1 : lot 5-130,
25 DICT50 sur cellules T1. Prélèvement d'un seul tube. Facteur
soluble non dilué).

Délai d'incubation cellules-virus	E X P E R I E N C E S N°							
	89 A	4 B	8 B	12 B	19 B	29 B	33 B	42 B
16 h	<3(°)							
1 j 24 h	< 3			< 3		< 3		
42 h	6	< 3		< 3	< 3			< 3
2 j 48 h	7	< 3		< 3	< 3	0		
56 h						< 3	< 3	
66 h	< 3	8			7			< 3
3 j 72 h	< 3	6		7	7	7	6	
81 h						7	3	
4 j 90 h		7		7				< 3
96 h	7	7	< 3		8	7		
192 h						7	7	
120 h		7	<3Ac(°°)	7	7		6	7
5 j 129 h						7		
6 j 144 h			< 3 Ac					
7 j 168 h			7	5	5		5	5
177 h								
8 j 192 h			6		5		5	
200 h								
9 j 216 h			5		5	5	5	
11 j 264 h			5					

(°) Titre du sérum de référence indiqué par le logarithme
du dénominateur en base 2.

(°°) Ac = anticomplémentaire

férences, par exemple, expérience 74B : à 72 et à 96 heures. Souvent, lorsqu'un des tubes donne un titre maximum c'est celui que l'on retrouve dans le mélange.

Dans la troisième série de 5 expériences, l'adénovirus type 1 (lot 5-400) a été introduit dans les tubes à lamelle à la dilution finale 10^{-2} (20 DICT50 pour une population moyenne de 400.000 cellules). Chaque prélèvement comporte 2 à 4 tubes et le liquide de chaque tube recueilli est séparé en 2 parties : une partie est congelée pour l'étude de la production du facteur soluble par tube et l'autre partie est mélangée à celle des autres tubes et congelée jusqu'à l'utilisation. Dans les 2 cas l'étude porte uniquement sur des liquides non dilués.

Nous rapportons dans le tableau 29 les titres du sérum de référence obtenus en présence des liquides isolés ou mélangés pour chacune des 5 expériences.

Le facteur soluble est apparu à 48 heures dans 1 cas sur 5, à 66 heures dans 1 cas sur 5 et à 72 heures dans les 3 autres cas. On note peu de différences entre les titres du sérum de référence en présence des liquides isolés ou en mélange. Souvent le titre du mélange correspond au titre le plus élevé obtenu à partir de chacun des tubes séparés ; exemple : expérience 93C, à 96 heures.

Enfin dans la quatrième série de 11 expériences, nous retrouvons les 5 expériences de la série précédente et 6 autres expériences où l'adénovirus type 1 (lot 5-400) a été introduit à la dilution 10^{-2} (20 DICT50 pour une population moyenne de 400.000 cellules). Les liquides correspondant à chaque prélèvement sont mélangés à volume égal et utilisés en dilution au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 pour la détection de la fraction soluble.

Pour 7 expériences, les prélèvements ont été effectués entre 48 et 72 heures selon le degré des lésions visibles au faible grossissement, jusqu'à 120 heures et quelquefois 7 à 10 jours.

Pour les 4 autres expériences, les prélèvements se sont échelonnés entre 9 et 192 heures (prélèvement matin et soir à intervalle de 9 heures). L'apparition des modifications cellulaires a lieu vers 48 heures.

Dans le tableau 30 nous exprimons les résultats précédents par un seul chiffre pour chaque délai d'incubation et pour chaque expérience en adoptant la règle énoncée page 37.

Il ressort que sur 8 expériences étudiées où les prélèvements ont été effectués à 48 et à 56 heures la fraction soluble apparaît dans 2 cas à 48 heures et dans 6 cas à 56 heures.

Si nous essayons de représenter graphiquement les résultats obtenus sur cellules de rein humain T1 pour chaque prélèvement de chaque expérience, nous voyons qu'il est possible de classer les courbes en 3 types :

Premier type de courbe (voir graphique 9) comportant 2 pics avec un minimum où il n'est pas possible de déceler de fraction soluble : c'est le cas des expériences 89A, 29B (1^{re} série), 74B (2^e série), 3E et 52F (4^e série). Le premier maximum est atteint à 48, 56 ou 72 heures, le deuxième à 72, 81 ou 96 heures et l'absence de facteur soluble a lieu entre 56 et 72 heures.

(Troisième série : 5 expériences. Adénovirus type 1 : lot 5-400, 20 DICT50 sur cellules T1. Prélèvement de 2 à 4 tubes. Facteur soluble non dilué).

E X P E R I E N C E S N°										
Délais d'incubation cellules-virus	67 C		77 C		87 C		93 C		10 D	
	Tubes isolés	Mélange	Tubes isolés	Mélange	Tubes isolés	Mélange	Tubes isolés	Mélange	Tubes isolés	Mélange
2 j	33 h		< 3- <3 < 3-<3	< 3 3	<3-<3-<3-<3	< 3			<3-<3-<3-<3 4- 6- 6- 6 <3- 3- 6- 7	< 3 7 6
3 j	66 h				7-<3-<3-<3 7-<3-<3-<3	3 8				
	72 h	< 3 (°) 3	3	5	6-<3-<3-<3 5-<3-<3-<3	7 7		< 4	5-<3- 7- 8 8- 7- 7- 7	7 7
4 j	90 h	6- 7	6	6	6-<3-<3-<3 5-<3-<3-<3	7 7		6		
	96 h	7- 6	6	5	6- 5- 3- 6 6- 5- 5- 7	7 6		6	7- 8- 7- 7 7- 7- 6- 6	7 6
5 j	105 h	5- 6	5	5						
	120 h	6- 6	6	4						
	126 h									
6 j	144 h							5		
7 j	168 h									
	177 h									
8 j	192 h									
	200 h									
10 j	216 h									
	240 h									
	259 h									

(°) Titre du sérum de référence indiqué par le logarithme du dénominateur de la fraction, en base 2 (log, 8 = 3)

TABLEAU 30

Réponse cellulaire à l'agression virale appréciée par la production de facteur soluble).
(*Quatrième série* : 11 expériences. Adénovirus type 1 : lot 5-400, 20 DICT50 sur cellules T1. Prélèvement de 4 tubes aux délais indiqués. Titrage par dilution du facteur soluble).

Délais-contact cellules-virus		E X P E R I E N C E S N°										
		67 C	77 C	87 C	93 C	10 D	26 D	36 D	3 E	42 F	52 F	65 F
1 j	9 h											
	24 h											
2 j	33 h											
	48 h											
3 j	56 h											
	72 h											
	81 h											
	90 h											
4 j	96 h											
	105 h											
5 j	120 h											
	129 h											
6 j	144 h											
7 j	168 h											
8 j	192 h											
9 j	216 h											
10 j	240 h											
	259 h											

Deuxième type de courbe comportant 2 pics avec un infléchissement net mais moins accentué que dans le premier type de courbe : ce sont les expériences 4B et 33B (1^{re} série) ; 25B (2^e série) ; 87C, 93C, 10D, 26D, 65F (4^e série). Le premier maximum est atteint de 48 à 96 heures, le deuxième de 90 à 120 heures et un minimum entre 72 et 105 heures (voir graphique 10).

Troisième type de courbe traduisant une augmentation progressive de la production de facteur soluble en fonction du temps d'incubation : ce sont les expériences 12B et 19B (1^{re} série) ; 67C, 77C, 87C, 93C et 10D (3^e série) ; 67C, 77C, 36D et 42F (4^e série) (voir graphique 11).

Enfin 3 expériences présentent une courbe de multiplication très lente, inhabituelle et non interprétable (8B, 42B et 90B).

β — Cultures sur cellules de reins de jeune lapin (primoculture)

Dans une première expérience, 46E, l'adénovirus type 1 (lot 5-400) a été introduit dans les tubes à lamelle à la dilution finale $10^{-1,39}$ (70 DICT50 environ pour les 800.000 cellules environ). A chaque prélèvement allant de 8 à 192 heures, 3 tubes sont retirés, les liquides sont mélangés et conservés à -20°C .

Dans une deuxième expérience, 63E, le même lot de virus 5-400 a été inoculé à la dilution finale $10^{-1,69}$ dans les tubes sans lamelle (20 DICT50 environ pour 400.000 cellules). A chaque prélèvement allant de 9 à 168 heures, 4 tubes sont retirés, les liquides sont mélangés et conservés à -20°C .

Le tableau 31 rapporte les résultats traduisant l'apparition et l'évolution du facteur soluble sur cellules de reins de lapin infectées par l'adénovirus type 1.

Il ressort que la fraction soluble apparaît à 81 heures (expérience 63E) ou à 96 heures (expérience 46E). Les courbes traduisant les résultats obtenus sont du premier type précédemment décrit : premier sommet entre 81 et 120 heures, deuxième sommet 120 à 168 heures, pas de facteur soluble décelable entre 96 et 144 heures selon les expériences.

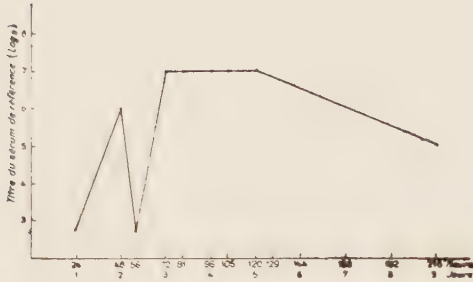
b) *Etude du virus total produit, virus intra et extracellulaire, après des délais de contact variables :*

Cette étude porte sur les mêmes prélèvements que ceux indiqués pour la cinétique de la production de la fraction infectante réalisée sur cellules de rein humain en lignée continue T1 infectées par l'adénovirus type 1 (lot 5-670) à raison de 13 DICT50 pour 100.000 cellules environ. Les prélèvements et le traitement des suspensions de virus recueillis sont identiques.

c) *Etude du virus libéré dans le milieu de culture chaque jour :*

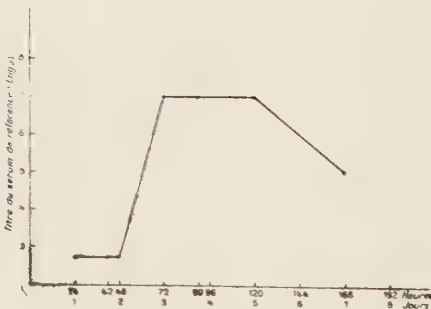
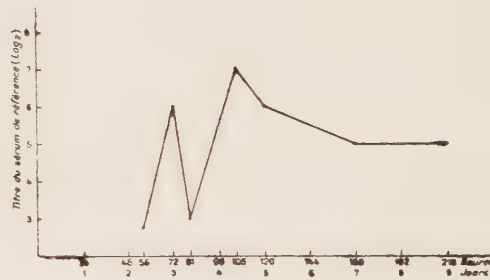
Les mêmes prélèvements que ceux utilisés pour la détection du pouvoir infectieux après des contacts variables cellules-virus, ont été repris.

Nous rapportons dans le tableau 32 les résultats concernant l'apparition et l'évolution de la fraction soluble soit dans le liquide



Graphique 9
(expérience 29 B)
Premier type de courbe

Graphique 10
(expérience 33 B)
Deuxième type de courbe



Graphique 11
(expérience 12 B)
Troisième type de courbe

MATERIEL « SOLUBLE »

Fraction virale extracellulaire - Adénovirus type 1 - Cellules T1

TABLEAU 31

Réponse cellulaire à l'agression virale
appréciée par la production de facteur soluble.

(Adénovirus type 1 : lot 5-400 : 20 DICT50, expérience 46 E ; 70 DICT50, expérience 63 E. Cellules de reins de lapin. Prélèvement de plusieurs tubes. Titrage par dilution de facteur soluble).

Délais contact cellules - virus Dilutions ↓	E X P E R I E N C E S N°						
	46 E			63 E			
	0 (°)	1 (°)	Titre (°°°)	0 (°)	1 (°)	2 (°)	Titre (°°°)
9 h	< 3 (°°)		< 3	< 3	< 3		< 3
1 j 24 h	< 3		< 3	< 3	< 3		< 3
33 h	< 3		< 3	< 3	< 3		< 3
2 j 48 h	< 3		< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
56 h	< 3		< 3				
3 j 72 h	< 3		< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
81 h	< 3		< 3	5	< 3		5
4 j 96 h	4		4	< 3	< 3		< 3
105 h	5	< 3	5	3	< 3		3
5 j 120 h	6	< 3	6	6	< 3		6
129 h	< 3	< 3	< 3				
6 j 144 h	< 3		< 3	5	< 3		5
7 j 168 h	6	< 3	6	3	4	< 3	4,5
8 j 192 h	5	< 3	5				

(°) Logarithme (en base 2) du dénominateur de la fraction indiquant la dilution du facteur soluble

(°°) Titre du sérum de référence indiqué par le logarithme du dénominateur de la fraction, en base 2 ($\log_2 8 = 3$)

(°°°) Titre de la substance soluble appréciée selon la règle énoncée page 37

TABLEAU 32

Cinétique de la réponse cellulaire
appréciée par la production de facteur soluble.

(Adénovirus type 1 : lot 5-670. Cellules T1)

Délais - Contact cellules - Virus	G R A T T A G E				L A V A G E	
	Inoculat : 13 DICT 50			1,6 DICT 50	13 DICT 50	
	3 G	7 G	14 G	92 F	7 G	14 G
0 j					< 3	
1 j	3 (°)	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
2 j	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
3 j	5	5	4,50	< 3	< 3	< 3
4 j	6,50	6,33	4	< 3	< 3	< 3
5 j	6,33	6,66	6	Ac	< 3	< 3
6 j	≥ 7	≥ 7,66	4,50	< 3	3	< 3
7 j	≥ 7,50		5,66	< 3	6	4
8 j	≥ 7,25			≥ 3	5	8,50

Ac = pouvoir anticomplémentaire

(°) Titre de la substance soluble appréciée selon la règle
énoncée page 37

total après grattage des cellules soit dans le milieu de lavage quotidien.

Il ressort de cette étude qu'il existe une différence importante dans la quantité de substance soluble produite décelable dans le milieu contenant les cellules et la quantité de substance soluble décelable dans le milieu chaque jour.

Le facteur soluble présent dans les milieux de lavage quotidien est décelable à partir du 6^e ou 7^e jour alors qu'il est décelable à 3 jours dans des cultures où nous avons procédé au grattage.

Les courbes traduisant la cinétique de la production de la substance soluble dans les milieux contenant les cellules après grattage sont du même type que celles précédemment décrites (voir graphiques 12 et 13) : les courbes correspondant aux expériences 3G et 7G sont du troisième type, celle correspondant à l'expérience 14G est du deuxième type.

Au cours de ces expériences nous avons pu montrer qu'en introduisant une très faible quantité de virus (lot 5-670 à la dilution $10^{-2,30}$ soit 1,6 DICT50 pour 100.000 cellules environ) dans les cultures cellulaires (expérience 92F) la production de facteur soluble est très diminuée. La substance soluble est décelable à partir du 5^e jour (au lieu du 3^e jour), non décelable au 6^e et 7^e jour mais décelable en faible quantité au 8^e jour (voir tableau 32).

3) Cinétique de la production du facteur soluble dans les cellules infectées par l'adénovirus type 5.

L'étude porte sur les mêmes prélèvements que ceux indiqués pour l'étude de la production de virus infectant. Le traitement des liquides recueillis reste le même.

Nous rapportons dans le tableau 33 et le graphique 14 les résultats traduisant la présence de substance soluble dans la fraction cellulaire et dans le milieu ambiant.

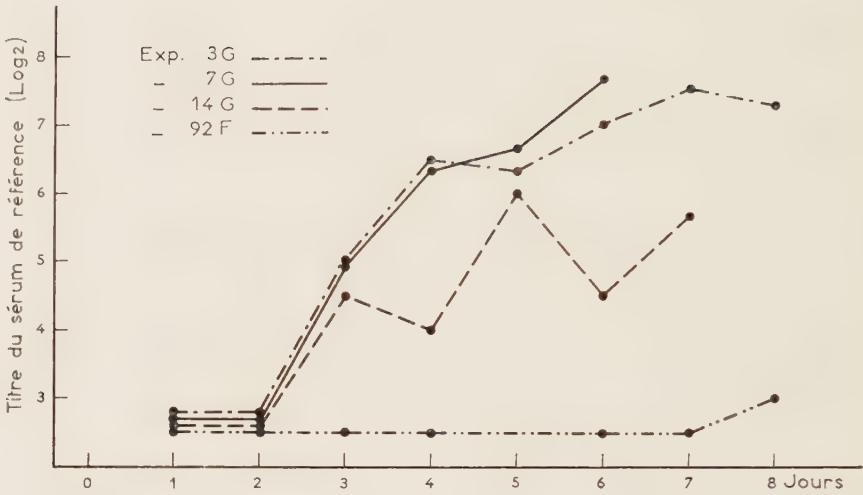
Il apparaît que le facteur soluble est décelable dans les cellules dès 24 heures à un taux élevé, puis augmente progressivement. Le facteur soluble est décelable dans le milieu ambiant à 72 heures seulement à un taux beaucoup plus faible.

4) Essai d'extraction de la fraction soluble des cellules.

Les résultats exposés au cours des travaux précédents montrent que la cellule réagit à l'agression virale en produisant du matériel soluble libéré en très faible quantité dans le milieu. La quantité de matériel soluble apparaît plus importante dans les cellules. Nous avons essayé de libérer cette fraction soluble intracellulaire par différents moyens.

L'expérience porte sur des cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 7.

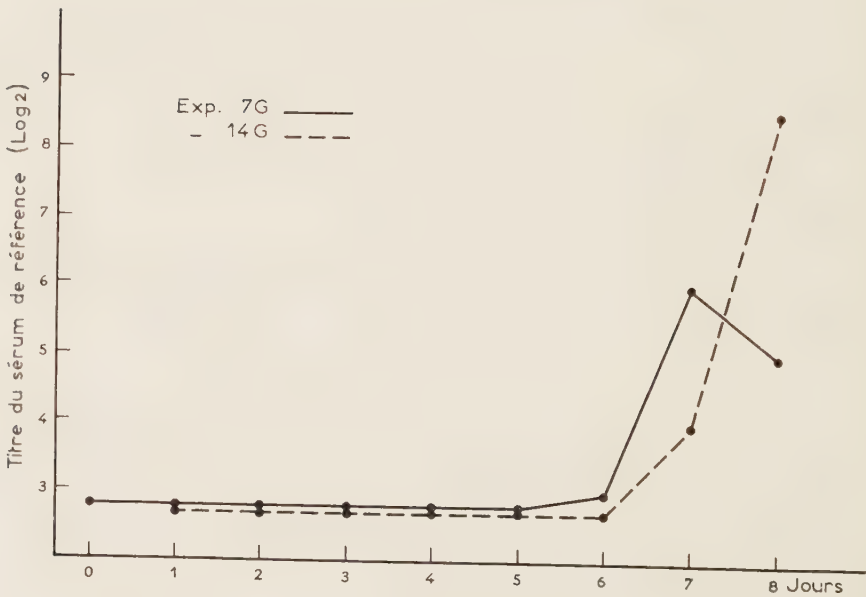
Les cellules HeLa sontensemencées dans des fioles de KOLLE à raison de 5×10^6 cellules pour 30 ml de milieu de croissance et placées 4 jours à 35°C. Le milieu de croissance est remplacé par 30 ml de milieu de survie et 1,5 ml de suspension de virus (lot



Graphique 12

MATERIEL « SOLUBLE »

Fraction virale intra et extracellulaire
Adénovirus type 1 - Cellules T1



Graphique 13

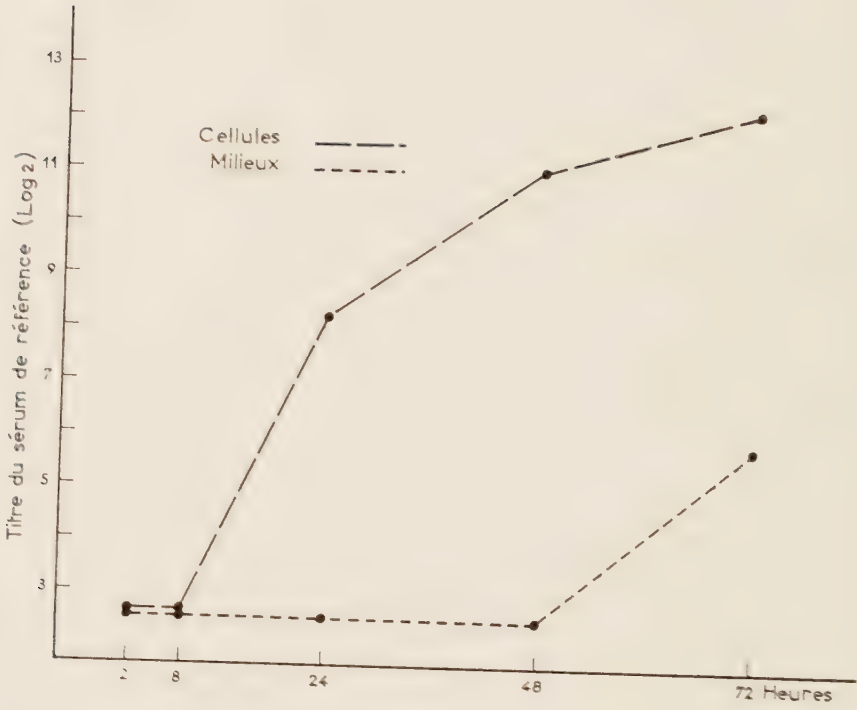
MATERIEL « SOLUBLE »

Fraction virale extracellulaire = Lavage quotidien
Adénovirus type 1 - Cellules T1

Cinétique de la réponse cellulaire à l'agression virale exprimée par la production de facteur soluble intracellulaire et extracellulaire. (Cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5).

Dilutions con- tact cellules-virus	V I R U S													TÉMOINS				
	SURNAGEANTS						HOMOGÉNÉISATS							SURNAGEANTS Titre (ooo)	HOMOGÉ- NEISATS Titre			
	0	1	2	3	Titre (ooo)	Titre moyen	0	1	2	3	4	5	6			7	Titre (ooo)	Titre moyen
	(°)						(°)											
2 h	< 3						< 3									< 3	< 3	
	(°)						< 3											
	< 3						< 3									< 3	< 3	
	< 3						< 3									< 3	< 3	
	< 3						< 3									< 3	< 3	
8 h	< 3						< 3									< 3	< 3	
	< 3						< 3									< 3	< 3	
	< 3						< 3									< 3	< 3	
	< 3						< 3									< 3	< 3	
	< 3						< 3									< 3	< 3	
24 h	< 3						6	5	5	4	4					0,80		
	< 3						-	4	< 3		5	4	3		< 3	10,25	8.23	
	< 3						7	6	-	5	< 3	4	3		< 3	8,50		
	< 3						7	6	4	3	3	< 3				8,60		
	< 3																	
48 h	< 3						-	7	7	6	6	6	6	6		≥ 11,25		
	< 3						-	7	7	6	6	6	5		≥ 11	≥ 11,01	< 3	
	< 3						6	7	6	6	6	6	4		≥ 11			
	< 3						-	6	6	6	6	5			≥ 10,83			
	< 3																	
72 h	4	4	3	< 3	5,66		-	5	5	6	6	5	5	5	3	≥ 12		
	5	5	< 3		6,33	5.79	-	5	5	6	6	5	5	5	4	≥ 12,14	≥ 12,15	< 3
	5	5	< 3		5		6	5	6	6	5	6	5	5	4	≥ 12		
	3	3	< 3		6		5	5	6	6	5	6	5	5	4	≥ 12,37		
	4	5	< 3		6		5	5	6	6	5	6	5	5	5	≥ 12,25		

(°) Logarithme (en base 2) du dénominateur de la fraction indiquant la dilution du facteur soluble.
(°°) Titre du sérum de référence indiqué par le logarithme du dénominateur de la fraction (en base 2).
(°°°) Titre de la substance soluble après application de la règle énoncée page 37



Graphique 14

MATERIEL « SOLUBLE »

Fraction virale intracellulaire et extracellulaire
Adénovirus type 5 - Cellules HeLa

TABLEAU 34

Réponse cellulaire à l'agression virale par la production de facteur soluble après extraction. (Cellules HeLa - Adénovirus type 7).

Suspension virus-cellules : 90 ml			
<i>Fraction A : 30 ml</i>		<i>Fraction B : 60 ml</i>	
Broyage 18.000 tours/minute 2 minutes		Centrifugation 3.000 tours/minute 10 minutes	
+			
Centrifugation 10.000 tours/minute 30 minutes			
Surnageant S ₁ 5-1499	Culot cellulaire + 5 ml PBS congelé et décongelé 5 fois Centrifugation 3.000 tours/minute 10 minutes	Surnageant S ₃ 5-1498	Culot cellulaire + 5 ml PBS congelé et décongelé 5 fois Centrifugation 3.000 tours/minute 10 minutes
Surnageant S ₂ 5-1499 C		Surnageant S ₄ 5-1498 C	

5-1490) soit 48 DICT50 pour 10×10^6 cellules. La dégénérescence des cellules est complète à 7 jours, mais celles-ci restent collées au verre. Les cellules sont décollées du verre par agitation des fioles à la main. Le milieu contenant les cellules en suspension est partagé en 2 fractions A et B (voir tableau 34).

La fraction A comprenant un volume de 30 ml est soumise à un broyage avec un broyeur à hélice à 18.000 tours/minute du type DUREL et SAUSSE pendant 2 minutes. Elle est ensuite centrifugée à 10.000 tours/minute pendant 30 minutes sur une centrifugeuse SORVALL type SS1. Le surnageant est recueilli et conservé congelé : lot 5-1499. Le culot de cellules est repris par 5 ml de solution tampon ou PBS (*) et soumis à un cycle de 5 congélations et décongélations successives. La suspension cellulaire est centrifugée à faible vitesse 3.000 tours/minute pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant obtenu constitue le lot 5-1499 C.

(*) Voir formule du PBS dans *Diagnostic Procedures for viral and Rickettsial diseases*, 1956, 2nd Edition.

American public Health Association, page 116.

La fraction B comprend un volume de 60 ml. Elle est centrifugée à faible vitesse 3.000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant est recueilli : lot 5-1498. Le culot cellulaire est repris par 5 ml de PBS et soumis à un cycle de 5 congélations et décongélations successives. La suspension de cellules est de nouveau centrifugée à faible vitesse 3.000 tours/minute pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant obtenu constitue le lot 5-1498 C.

Les titres de fraction soluble obtenus à partir de chaque lot sont résumés dans le tableau 35.

TABEAU 35

N° du lot	Titre de la fraction soluble (*)
5-1498	7
5-1498 C	> 12
5-1499	7,66
5-1499 C	8,33

(*) Titre de la fraction soluble appréciée selon la règle énoncée page 37.

Il apparaît que le broyage de la suspension cellules-virus libère une certaine quantité de matériel soluble, le titre du lot 5-1499 étant supérieur à celui du lot 5-1498. Cette libération est accentuée lorsque les cellules sont soumises à un cycle de congélation et décongélation successives, lots 5-1498 C et 5-1499 C.

La congélation et décongélation paraît plus efficace sur des cellules non soumises à un traitement mécanique, lot 5-1498 C.

5) Résumé.

L'étude de la production du facteur soluble, décelable par la réaction de fixation du complément faisant intervenir des anticorps spécifiques en quantité connue, permet de dégager les faits suivants :

a) Une étude générale des adénovirus types 1 à 16 montre que le titre traduisant la production de matériel soluble sur différentes cellules varie peu selon les cellules. Il semble cependant que la production soit plus régulière sur cellules HeLa, elle est irrégulière sur cellules de reins humains T1 (le matériel produit est souvent anticomplémentaire et les titres sont un peu plus bas), elle est très faible sur cellules de reins de lapin.

Tous les types de virus sont également capables de produire le facteur soluble à des titres assez élevés (sauf peut-être le type 8 peu satisfaisant), quelle que soit la rapidité de dégénérescence cellulaire.

Lorsque la dégénérescence des cellules est très rapide accompagnée d'une chute en 24 à 48 heures, le titre traduisant la quantité de matériel soluble est faible ou très faible. On rapporte ce phénomène à un effet dit « toxique » sans multiplication de virus. La production de facteur soluble est ainsi liée à la multiplication virale.

b) Une étude particulière concerne la cinétique de la réponse cellulaire par la production de facteur soluble par l'adénovirus type 1 infectant les cellules T1 ou les cellules de reins de jeune lapin. Le milieu dans lequel baignent les cellules est recueilli dans des délais variant entre 9 et 259 heures. Ce milieu contenant le virus extracellulaire conservé congelé est centrifugé au moment de l'utilisation.

A ce propos, plusieurs remarques peuvent être faites :

1 - Si des cellules T1 sont préparées dans des conditions identiques et infectées par l'adénovirus type 1 de sorte qu'on ait une dégénérescence cellulaire visible au microscope à faible grossissement en 2 à 3 jours, l'expérience est reproductible d'un lot de cellules à l'autre et d'un lot de virus à l'autre. (Trois expériences sur 27 seulement n'ont pas présenté les altérations caractéristiques en 2 à 3 jours).

2 - L'apparition du facteur soluble sur cellules T1 suit toujours l'apparition des lésions cellulaires (48 à 66 heures).

3 - Le développement du facteur soluble paraît retardé sur cellules de reins de jeune lapin par rapport aux cellules T1 (81 à 96 heures au lieu de 48 à 72 heures).

4 - La quantité de substance soluble élaborée ne paraît pas en rapport avec le degré de lésions cellulaires.

5 - Les courbes traduisant la cinétique de la fraction soluble produite par l'adénovirus type 1 en culture sur les cellules T1 se ramènent à 2 types :

— *Premier type de courbe* présentant 2 pics et un minimum où il n'est pas possible de déceler la fraction soluble libérée.

— *Deuxième type de courbe* traduisant une augmentation continue de la multiplication virale.

Ces 2 types de courbe se retrouvent dans toutes nos expériences : deux lots de virus différents, prélèvement d'un seul tube, prélèvement de 2 à 5 tubes dont les liquides contenant le facteur soluble sont utilisés en présence de sérum de référence, et sont engagés non dilués ou à des dilutions de 1/2 en 1/2.

Nous avons pu reproduire une courbe du premier type en utilisant soit des cellules de rein humain T1, soit des cellules de reins de jeune lapin.

Lorsque le milieu et les cellules sont recueillis chaque jour dans les délais de 24 à 216 heures conservés congelés, puis soumis à un cycle de 3 congélations et décongélations successives, le virus total intra et extracellulaire est titré. Les 2 types de courbes peuvent se retrouver.

Si on recueille tous les jours le milieu renouvelé toutes les 24 heures sur les cellules infectées, on a le virus extracellulaire libéré au cours de cette période. La courbe obtenue appartient au deuxième type. L'apparition de la fraction soluble est très retardée et le titre est très faible.

c) Une autre étude concerne la cinétique de la production par les cellules HeLa de matériel soluble dû à l'adénovirus type 5. A chaque prélèvement le milieu est séparé des cellules, de sorte que le titrage de la fraction soluble porte sur la production extracellulaire et intracellulaire.

La fraction soluble est décelable dans les surnageants seulement à 72 heures à un titre élevé. Elle apparaît dans les cellules dès 24 heures après l'infection et augmente progressivement jusqu'à 72 heures.

d) L'expérience réalisée sur l'adénovirus type 7 infectant des cellules HeLa montre que même de faibles doses de virus suffisent aux cellules pour qu'elles élaborent du matériel soluble. Toutefois elles retiennent ce matériel nouvellement formé d'une manière telle qu'il est difficile de l'extraire. Dans ce but les congélations et décongélations successives représentent un meilleur traitement que le broyage à haute vitesse.

C. — RAPPORT ENTRE L'APPARITION ET L'ÉVOLUTION DE LA FRACTION SOLUBLE ET L'APPARITION ET L'ÉVOLUTION DU MATÉRIEL INFECTANT

Nous avons tenté de comparer les courbes traduisant l'apparition et l'évolution de la fraction soluble et les courbes traduisant l'apparition et l'évolution du matériel infectant sur les différentes cellules utilisées : cellules T1, cellules de reins de lapin et cellules HeLa.

Nous avons vu que ces courbes peuvent se classer en 3 types :

— *premier type de courbe* avec 2 pics et un minimum très bas correspondant à un délai où il y a peu ou pas de virus décelable.

— *deuxième type de courbe* avec 2 pics séparés par une ligne présentant un infléchissement net mais moins important que le premier.

— *troisième type de courbe* avec un plateau.

1) Cinétique de la multiplication de l'adénovirus type 1 sur cellules de rein humain (souche T1).

Nous rapportons dans les graphiques 15, 16 et 17 la comparaison entre les courbes traduisant l'apparition et l'évolution du matériel soluble et du matériel infectant, lorsque nous avons étudié la teneur en virus du milieu recueilli après des délais de contact variables. Les expériences 3E, 93C et 36D paraissent les plus caractéristiques.

Le *graphique 15* (expérience 3E) montre que la courbe traduisant l'apparition et l'évolution du matériel soluble appartient

au premier type de courbe (maxima à 56 et 120 heures, minimum à 72 heures) ; la courbe traduisant les modalités du développement du matériel infectant, après lecture à 7 jours, appartient au deuxième type (maxima à 56 et 120 heures et minimum à 72 heures) ; après lecture à 14 jours cette courbe appartient au troisième type, le maximum étant atteint à 105 heures.

Le *graphique 16* (expérience 93C) montre que la courbe traduisant l'apparition et l'évolution du matériel soluble appartient au deuxième type de courbe (maxima à 81 et 168 heures et inflexion nette à 96 heures). Le courbe traduisant les variations du matériel infectant après lecture à 7 jours, appartient au premier type (maxima à 168 et 259 heures, inflexion de 192 à 240 heures) ; après lecture à 14 jours, elle appartient également au premier type (maxima à 168 et 259 heures et inflexion à 216 heures).

Le *graphique 17* (expérience 36D) montre que la courbe traduisant les variations de matériel soluble appartient au troisième type avec un maximum à 129 heures. La courbe traduisant les modalités du développement du matériel infectant, après lecture à 7 jours appartient au premier type de courbe (maxima à 144 et 192 heures et inflexion nette à 168 heures) ; après lecture à 14 jours, elle appartient au troisième type, le maximum étant à 120 heures.

Il ressort de cette étude qu'il n'y a pas de corrélation entre les types de courbes obtenues pour le matériel soluble et le matériel infectant.

Les délais d'apparition du matériel soluble et du matériel infectant paraissent différents. C'est ainsi que nous constatons la présence de particules infectantes dès 24 heures après l'infection, après lecture à 14 jours, et 33 heures après l'infection, après lecture à 7 jours, alors que la fraction soluble apparaît 48 à 72 heures après l'infection.

L'examen des tableaux 20, 21, 22, 27, 28, 29, 30 ne nous permet pas d'indiquer un ordre préférentiel des pics observés. Nous pouvons seulement dire que les délais d'apparition des maxima pour le matériel soluble sont :

— premier maximum 48 à 144 heures et plus généralement 56 à 81 heures.

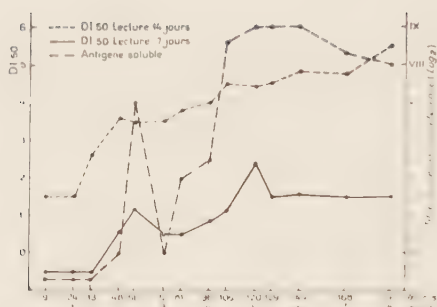
— deuxième maximum 81 à 168 heures et plus généralement entre 96 et 120 heures.

Les délais d'apparition des maxima pour les particules infectantes sont :

— premier maximum 56 à 168 heures et généralement 96 à 120 heures.

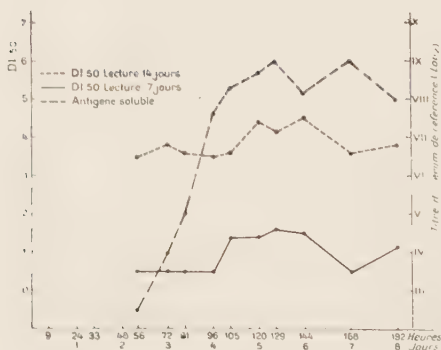
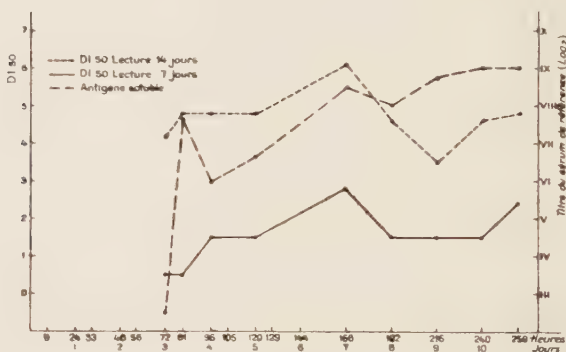
— deuxième maximum 105 à 129 heures généralement. Les 2 phénomènes semblant différents.

Lorsque nous avons étudié la teneur en virus total du milieu et des cellules après des délais de contact variable, les courbes traduisant l'apparition et l'évolution du matériel soluble et du matériel infectant ne paraissent pas montrer de relation.



Graphique 15
(expérience 3 E)

Graphique 16
(expérience 93 C)



Graphique 17
(expérience 36 D)

TITRE INFECTIEUX - MATERIEL « SOLUBLE »

Fraction virale extracellulaire - Adénovirus type 1 - Cellules T1

Le virus infectant apparaît au 5^e ou 6^e jour (lecture à 7 jours) et au 3^e ou 4^e jour (lecture à 14 jours) à un titre très faible. Le matériel soluble apparaît entre le 6^e et le 7^e jour à un titre faible.

Les tableaux 22 et 32 montrent que les courbes se rapprochent de celles obtenues dans l'expérience précédente. Elles appartiennent au deuxième ou au troisième type. Dans le troisième type de courbe se classent les expériences 3G, 7G et 14G après lecture à 7 jours du pouvoir infectieux, les expériences 3G et 14G lorsque la lecture est faite à 14 jours et les expériences 3G et 7G pour la production de facteur soluble.

Dans l'expérience 7G la courbe traduisant l'évolution du matériel infectant appartient au deuxième type lorsque la lecture est faite au 14^e jour. Dans l'expérience 14G la courbe traduisant l'apparition et l'évolution de la fraction soluble appartient au deuxième type.

2) Cinétique de la multiplication de l'adénovirus type 1 sur cellules de reins de lapin.

L'examen des tableaux 20 à 23 et 27 à 32 montre qu'il n'y a pas de relation entre les délais d'apparition et l'évolution du matériel infectant et du matériel soluble.

3) Cinétique de la multiplication de l'adénovirus type 1 sur cellules. HeLa.

L'examen des tableaux 24 et 33 et des graphiques 8 et 14 montre que les courbes traduisant l'apparition et l'évolution du matériel soluble et du matériel infectant appartiennent au troisième type.

Dans les milieux de culture, on note une augmentation du titre infectieux après 48 heures de contact cellules-virus. Le matériel soluble n'est décelable qu'à partir de 72 heures.

Dans la fraction cellulaire, le matériel infectant apparaît dès 24 heures de contact cellules-virus. Huit heures après l'infection, pas de virus décelable. La fraction soluble n'est décelable qu'après 24 heures.

Ces résultats montrent qu'il ne semble pas y avoir de corrélation entre les modalités du développement du matériel infectant et l'apparition et l'évolution de la fraction soluble.

4) Résumé.

Les études faites sur la cinétique du développement du matériel infectant et de la fraction soluble des adénovirus type 1 et type 5, montrent que les 2 phénomènes sont liés mais différents. Ils sont liés en ce sens qu'ils représentent tous les deux des manifestations de la multiplication du virus dans les cellules. Les courbes traduisant leur évolution ont une allure comparable évoquant une production par vagues successives. Cependant, elles ne sont généralement pas superposables. La nature des cellules ne semble pas intervenir dans l'évolution des 2 phénomènes. Les

délais d'apparition du matériel soluble sont différents de ceux du matériel infectant. Tout au plus peut-on dire que l'apparition du matériel soluble est postérieure à l'apparition des modifications cellulaires.

II. — DISCUSSION.

A. — METHODES FAISANT INTERVENIR LES MODIFICATIONS CELLULAIRES MORPHOLOGIQUES

1) Etude de la sensibilité et de la réceptivité cellulaire à l'agression virale.

a) *Réponse des cellules :*

Au cours de notre étude sur les cellules HeLa, T1, reins de jeune lapin et cellules amniotiques humaines nous avons pu observer des variations de titres exprimant le pouvoir infectieux. Les cellules HeLa apparaissent comme étant les plus sensibles : les titres des suspensions de virus sont plus élevés sur cellules HeLa de 1 à 2 unités par rapport aux cellules T1. Les cellules amniotiques donnent des titres voisins de ceux obtenus avec les cellules T1 mais les délais sont plus longs : première lecture à 10 jours au lieu de 7 jours, deuxième lecture à 18 jours au lieu de 10 jours.

Les cellules épithéliales d'origine animale (rein de singe, de lapin, de porc, de veau, de chien) donnent les mêmes lésions que les cellules épithéliales d'origine humaine (HUEBNER et coll., 1954 - 175; BALDUCCI et coll., 1956 - 12; GUÉRIN, 1957 - 154; DOSSENA, 1961 - 73; KAPSENBERG, 1959 - 183). Les cellules épithéliales sont atteintes avant les cellules fibroblastiques. Il arrive qu'il soit nécessaire d'attendre 69 jours (ROWE et coll., 1953 - 293) sans observer de lésions sur des fibroblastes et de faire de nombreux repiquages pour avoir les lésions typiques. ROWE et coll. (1955 - 294) ont montré que les cultures de cellules d'embryon humain donnent les mêmes altérations que les cultures d'adultes.

ROWE et coll. (1953 - 293) obtiennent des dégénérescences cellulaires de tissus d'hamsters ou d'embryons de poulet mais n'en obtiennent pas avec des tissus provenant de trachée d'embryon de veau, de souris, de testicules de singe ou de trachée de porc.

BALDUCCI et coll. (1956 - 12) observent des lésions sur cellules HeLa, poumons d'embryon humain, rein d'embryon humain, fibroblastes humains, rein humain, reins de singe, reins de lapin. Ils n'ont pas d'altérations sur cellules d'embryons de poulet.

JORDAN (1956 - 181) montre que les lignées DMB et DHov provenant de la muqueuse nasale ne permettent pas l'isolement d'un adénovirus sauf celui d'une souche provenant d'un prélèvement effectué chez un travailleur du laboratoire.

Il semble que les cultures d'épithéliums ciliés du système respiratoire soient peu sensibles aux adénovirus bien qu'ils soient particulièrement favorables à leur développement chez l'homme. BARSKI et coll. (1957 - 21). Il en est de même du système cilié sexuel humain BARSKI (1958 - 17).

DUCAN (1960 - 78) souligne la sensibilité des cellules provenant de thyroïde humaine. Les cellules amniotiques apparaissent aussi sensibles à l'adénovirus type 5 que les cellules HeLa ou les cellules Détroit 6, selon NASZ et coll. (1958 - 242). GRAYSTON et coll. (1958-148) ont fait une étude de réceptivité de 14 lignées cellulaires continues cancéreuses ou non avec l'adénovirus type 3 ; ils notent quelques différences. EVANS (1958 - 104) fait remarquer qu'il a pu utiliser avec succès les cellules cancéreuses HeLa, KB ou HEp2 aussi bien que les fibroblastes humains ou les cellules de reins de singe.

Les cellules de reins de singe ont également fait l'objet de nombreux travaux. Elles conviennent mieux pour la préparation de grandes quantités de virus utilisées pour le vaccin. HARTLEY et coll. (1956 - 159) montrent qu'il est possible d'isoler les adénovirus mais au 2^e passage il n'y a plus de lésions. Par contre si l'isolement du virus a été effectué sur des cellules humaines telles que les cellules de trachée ou les cellules amniotiques, on retrouve les lésions au cours des passages successifs sur cellules de reins de singe, HILLEMANN et coll. (1957 - 168).

Selon BARSKI et coll. (1958 - 22) les cellules de testicules ou de rate de lapin sont plus sensibles aux adénovirus que les cellules épithéliales de trachée. Il semble que les lésions ne soient plus observées après le 4^e ou 5^e passage. KELLY et coll. (1957 - 188) ont remarqué la dégénérescence très lente des cellules de reins de jeune lapin infectées par l'adénovirus.

LARKIN et coll. (1960 - 204) obtiennent des réponses cellulaires importantes en introduisant virus et cellules simultanément.

SCHLUEDEBERG (1960 - 302) signale la persistance des anticorps dans les cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 2, ce qui entraîne une diminution de la sensibilité des cellules.

En résumé, il semble donc que la réceptivité des cellules aux adénovirus soit variable : les cellules épithéliales sont plus sensibles que les cellules fibroblastiques, qu'elles soient d'origine animale ou humaine. Les cellules HeLa sont celles qui ont été les plus étudiées et paraissent les plus sensibles. Ainsi le problème de la réceptivité cellulaire apparaît lié à la nature des constituants du virus et de la cellule.

b) *Constance des cellules :*

Nos propres observations montrent que les cellules répondent de manière sensiblement uniforme à l'agression virale. Un même lot de virus titré sur cellules T1 donne des DICT50 comparables, dans les limites acceptables avec la méthode utilisée. PEREIRA et coll. (1957 - 262) ont établi que l'expression graphique de la réponse de la population cellulaire à des doses variables d'adénovirus se traduit par une droite. Il est possible d'en déterminer la position avec précision. Les travaux de LORENZ (1960 - 223 ; 1960 - 224) montrent dans quelles conditions les titrages de suspensions virales sont valables : les dilutions doivent se faire selon une progression géométrique, (la base 10 est celle qui donne le moins d'erreurs), un nombre suffisant de tubes pour chaque dilution (4 à 5 au minimum). L'erreur la plus importante semble due à la façon

d'utiliser la pipette. Pour remédier à ces difficultés, un même jeu de pipettes est utilisé au cours de l'opération, chaque dilution étant faite avec une nouvelle pipette.

GINSBERG (1958 - 137) utilisant 2 tubes par dilution arrive à une déviation standard de 0,15 sur un titrage. PEREIRA et coll. (1958 - 263) utilisant le calcul d'erreur selon PIZZI (1950 - 271), rapportent une moyenne d'erreur sur la DICT50 comprise entre 0,18 et 0,30. Notre calcul d'erreur (moyenne 0,29 à 7 jours, 0,32 à 10 jours) est voisin de celui obtenu par PEREIRA et coll. (1958 - 263) et par d'autres auteurs étudiant des virus différents tel que le virus poliomyélique. C'est ainsi que GARD (1955 - 128) rapporte les résultats portant sur 49 titrages de virus poliomyélique (souche Theiler) : les titres vont de 4,1 à 5,9, la moyenne est 5,03 et l'écart type 0,38. Nous devons remarquer qu'au cours de nos travaux effectués avec d'autres virus tel que le virus poliomyélique type 1, 2 ou 3, nous retrouvons des résultats comparables. A titre d'exemple, nous rapportons ceux obtenus à partir du même lot de virus poliomyélique type 1 (1-84) comprenant 55 titrages, dans le tableau 36.

TABLEAU 36

Valeurs extrêmes	6,32 - 8,37
Titre moyen	7,51
Ecart type	0,42
Pourcentage d'erreurs sur la moyenne	5,6
Erreur moyenne (ED50) sur les DICT50	0,37

L'examen des tableaux 17 et 18 montre que la *durée d'observation des cellules* soumises à l'agression par adénovirus n'est pas négligeable. C'est la raison pour laquelle nous rapportons toujours les résultats après lecture du 7^e jour et ceux après lecture du 10^e ou 14^e jour. Les titres sont nettement plus élevés au 10^e ou au 14^e jour qu'au 7^e jour. GRAYSTON et coll. (1958 - 147) ont bien montré l'importance des délais d'observation au cours des titrages du virus type 3 : la DICT50 est de 3,50 à 7 jours, elle passe à 8,50 après 52 jours d'observation.

c) Comportement des cellules en présence des différents types de virus utilisé :

Tous les *types d'adénovirus* semblent provoquer des altérations cellulaires visibles à un faible grossissement. C'est ainsi que les 6 premiers types d'adénovirus ont pu être mis en évidence par ROWE et coll. (1955 - 294). Par la suite, les mêmes auteurs (ROWE et coll., 1956 - 295 ; 1958 - 296) observent des modifications dans la production des altérations cellulaires selon les types de virus. Les cellules HeLa infectées par les adénovirus d'origine humaine

types 9 et 10 présentent des lésions discrètes. L'adénovirus type 18 d'origine humaine et le type M1 d'origine simienne ne provoquent pas d'altérations cellulaires sur cellules HeLa. L'emploi de cellules de reins de singe est indispensable.

De même, JAWETZ et coll. (1955 - 177 ; 1958 - 178 ; 1959 - 179) observent une dégénérescence très lente des cellules infectées par l'adénovirus type 8. Les titres des suspensions virales sont très bas 10^{-1} à 10^{-2} par ml au 12^e passage.

BELL et coll. (1960 - 24) isolent plus facilement l'adénovirus type 3 sur cellules d'embryons humains que sur cellules HeLa. Selon FOGH et coll. (1960 - 120) les cellules FL paraissent nettement plus sensibles à l'adénovirus 1.

ROSEN et coll. (1961 - 299) observent une dégénérescence très lente des cellules KB ou HeLa lorsqu'elles sont infectées par les types 25 à 28. Il arrive même qu'il soit nécessaire de faire 2 passages aveugles avant d'obtenir une dégénérescence indiscutable.

Il apparaît donc que les cellules réagissent de manière différente à l'infection virale selon le type d'adénovirus. Les cellules sensibles réagissent toujours mais dans des délais plus ou moins longs. Elles produisent plus ou moins de particules infectantes. Jusqu'à maintenant il est très difficile de prévoir le mécanisme de la réponse cellulaire : s'agit-il d'un état particulier dans lequel se trouve la cellule lorsqu'elle est en présence de cette nucléoprotéine complexe que représente le virus ? S'agit-il d'une constitution chimique différente des particules infectantes selon qu'elles appartiennent à tel ou tel type ? Peut-être pourrions nous penser à une modification ou à une inactivation du matériel viral pénétrant dans la cellule. L'inactivation serait l'hypothèse la moins sûre car de nombreux travaux tendent à montrer que l'adénovirus est très résistant à l'éther, aux antibiotiques, à la température, à la centrifugation, aux variations de pH. Ce sont les expériences de GINSBERG (1956 - 135 ; 1956 - 136), DENNY et coll. (1961 - 68), HILLEMANN et coll. (1955 - 167), SUNAGA et coll. (1960 - 318).

Les variations dans la modalité et la rapidité de dégénérescence cellulaire paraissent intéressantes car elles permettent d'orienter nos expériences. C'est ainsi qu'un adénovirus type 8 qui provoquerait une dégénérescence rapide des cellules serait aberrant et suspect. HANNA et coll. (1962 - 157) confirment notre observation au sujet du type 8.

Les titres des suspensions de virus que nous avons préparées sont voisins de ceux publiés par les auteurs. HARTLEY et coll. (1956 - 159) rapportent sur cellules HeLa les titres de $10^{-4,5}$ à 10^{-6} par 0,1 ml pour les types 1, 2, 3, 5, 6 et $10^{-3,5}$ pour le type 4.

d) *Comportement des cellules en présence de doses variables de virus :*

Les recherches sur la réceptivité des cellules aux adénovirus ont très vite montré que la quantité de virus introduite n'est pas sans importance. On a remarqué depuis longtemps qu'une forte dose de virus entraîne des modifications cellulaires précoces sans rapport avec les altérations plus tardives. ROWE et coll. (1953-293) puis KJELLEN (1956 - 192) ont montré qu'il existe une relation

entre la dose de virus et le temps nécessaire à l'apparition des lésions cellulaires.

Les effets précoces seraient de nature « toxique » tandis que l'effet tardif serait une manifestation de la propriété infectante du virus. Les modifications cellulaires représentent une conséquence de la multiplication du virus et des altérations de la cellule-hôte. On sait que le virus de la grippe provoque des altérations cellulaires sans relation avec la multiplication du virus (HENLE et coll., 1955 - 163). Il semble que cet effet « toxique » nécessite bien une infection massive et dépend sans doute de l'action synergique de toutes les particules virales. Un autre caractère permet de distinguer l'effet « toxique » : sa plus grande résistance aux rayons ultraviolets comme l'ont prouvé PEREIRA et coll. (1957 - 262), PEREIRA (1958 - 258). Ces auteurs ont également montré combien il est difficile de distinguer l'effet « toxique » de l'effet dû au virus infectant car les cellules HeLa sont très sensibles aux adénovirus. KELLY et coll. (1957 - 188) ont alors l'idée d'utiliser les cellules de reins de lapin pour dissocier les 2 effets. De très fortes doses de virus sont nécessaires pour observer des modifications cellulaires. Ces altérations cellulaires sur cellules de reins de lapin pourraient s'expliquer par l'action synergique de particules virales ou par la présence d'un matériel toxique particulier. Nos propres observations confirment celles rapportées ici.

PEREIRA et coll. (1957 - 262), EVERETT et coll. (1958 - 105), ROWE et coll. (1958 - 297), proposent de diminuer les effets « toxiques » en ajoutant un peu de trypsine à la suspension virale utilisée pour l'expérience.

DENNY et coll. (1961 - 68) travaillant avec l'adénovirus type 14 sur cellules HeLa, montrent que l'introduction de grandes quantités de particules infectantes sur les cellules, provoque des signes de toxicité, même avec des suspensions de virus purifié par la trypsine.

Différentes études sont faites pour déterminer la nature du produit « toxique » responsable de l'arrondissement et de la rétraction des cellules infectées par l'adénovirus type 5 dans des délais aussi précoces que 3 à 4 heures après l'infection.

PEREIRA (1958 - 257) montre que l'effet « toxique » est détruit par action de la trypsine. L'action de la trypsine semble réversible. Cette activité « toxique » serait due à une protéine. En 1960, PEREIRA (261) réussit à isoler 3 fractions différentes des particules infectantes : A, B et C. Il montre que la fraction B est responsable des altérations cellulaires précoces. Le facteur B est détruit par la trypsine. Les études faites sur la précipitation par diffusion dans le gel et les études chromatographiques suggèrent que la fraction B est un complexe formé d'une protéine β sensible à la trypsine et de la fraction C résistante à la trypsine.

EVERETT et coll. (1958 - 105) remarquent que si la suspension virale est chauffée à 56°C ou 100°C, l'activité toxique reste stable : elle est particulièrement inactivée à 60°C pendant 15 minutes, elle est détruite à 100°C pendant 2 minutes. Cette fraction est séparable par centrifugation à haute vitesse, 105.400 g sur une centrifugeuse type SPINCO pendant 60 minutes. L'ac-

tivité cytotoxique se retrouve dans le surnageant tandis que le culot ne contient que des particules infectantes. Elle est neutralisée par les anticorps homologues mais non par les anticorps de type hétérologue. L'effet « toxique » observé est dû à une protéine.

Il semble que l'activité « toxique » de cette protéine soit différente de celle observée avec le virus poliomyélitique ou les virus grippaux. Elle est inactivée par action de la trypsine et reste stable après action de la ribonucléase ou la désoxyribonucléase.

Par la suite, PEREIRA (1960 - 260) met en évidence chez des cellules HeLa infectées par des adénovirus types 1, 2, 4, 5 et 6, la production d'un facteur capable d'empêcher la dégénérescence de cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5, le virus poliomyélitique type 1 ou le virus vaccinal. Cet inhibiteur serait différent de l'interferon et serait associé aux composants spécifiques B et C précédents.

WILCOX et coll. (1961 - 339) traitant les cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5 par la PFPA (p- fluorophénylalanine), observent une inhibition de la synthèse de la substance « toxique » ainsi que du matériel soluble et infectant. Les auteurs pensent que ces 3 fractions représenteraient des précurseurs du matériel viral.

2) Cinétique de la réponse cellulaire quel que soit le type d'adénovirus.

a) *Notion d'une évolution de type cyclique :*

Nos études sur l'apparition et l'évolution de la quantité de virus produite au cours de l'infection de cellules T1, reins de lapin ou HeLa par les adénovirus type 1 ou 5 nous conduisent à la notion d'un cycle ou d'une évolution de type cyclique.

Les expériences sur cellules T1 ou cellules de reins de lapin, soumises à l'agression de l'adénovirus type 1, et dans lesquelles la quantité de virus extracellulaire est titrée, après des délais variables de contact cellules-virus, semblent montrer l'existence d'un processus diphasique. Les deux sommets de la courbe se situent entre 48 et 168 heures.

Les expériences sur cellules T1, soumises à l'agression de l'adénovirus type 1, dans lesquelles la quantité totale de virus produit, intra et extracellulaire, est titrée traduisent également l'existence d'un processus diphasique. L'allure de nos courbes confirme celle trouvée par GINSBERG (1958 - 138) pour l'adénovirus type 1.

Lorsque la quantité de virus introduite est très faible, voisine de 1 à 2 DICT50 pour 200.000 cellules, la production de virus est considérablement ralentie mais existante. Nous avons encore la présence d'une évolution cyclique.

Les expériences sur cellules T1 soumises à l'agression de l'adénovirus type 1, dans lesquelles la quantité de virus extracellulaire libérée chaque jour est titrée, donnent une courbe ayant une allure continue.

Enfin les expériences sur cellules HeLa avec l'adénovirus type 5, traduisent la quantité de virus intracellulaire d'une part et extracellulaire d'autre part. Les courbes obtenues ont une allure continue.

Ainsi nous voyons que les cellules réagissent à l'agression virale en produisant régulièrement du virus à partir de 24 heures.

Le virus produit s'accumule dans la cellule, c'est le virus intracellulaire, qu'il est possible de déceler en faisant éclater les cellules par des broyages (PEREIRA et coll., 1957 - 262), par l'action des ultrasons (FUKUMI et coll., 1957 - 127) ou par des séries de congélation et décongélation successives que nous avons utilisées ainsi que d'autres auteurs : GINSBERG (1956 - 135 ; 1958 - 137), DENNY et coll. (1961 - 68), LIEBERMAN et coll. (1959 - 216). La quantité de virus obtenue est d'autant plus élevée que le délai de contact cellules-virus est plus long (48 à 72 heures). Une très faible quantité de virus produit par la cellule est libérée dans le milieu. Nos observations correspondent à celles faites par DENNY et coll. (1961 - 68), GINSBERG (1956 - 135 ; 1958 - 137), PEREIRA et coll. (1957 - 262), LIEBERMAN et coll. (1959 - 216).

Lorsque le temps de contact du virus avec les cellules est court, 2 ou 8 heures, le titre du milieu est équivalent à la dilution de virus introduite. Le même phénomène a été retrouvé par BOYER et coll. (1960 - 40) travaillant avec l'adénovirus type 5 sur cellules HeLa. Avec l'adénovirus type 7, les auteurs n'ont pas de particules infectantes décelables avant 20 heures d'incubation. Avec l'adénovirus type 4, CORSELLO et coll. (1961 - 53) n'observent pas de particules infectantes décelables avant 24 heures dans la fraction cellulaire et 48 heures dans la fraction extracellulaire.

Ainsi se trouve posé le problème de la pénétration du virus dans la cellule. GINSBERG (1956 - 135) a insisté sur la difficulté de cette étude en ce qui concerne les adénovirus. Il est nécessaire de multiplier les observations portant sur un grand nombre de cellules. Après de nombreux travaux, les modalités de l'adsorption du virus sur les cellules, la période de latence (pouvant être assimilée dans une certaine mesure au délai nécessaire pour voir apparaître les premières lésions) ont pu être précisées.

α — Définition de la période d'adsorption.

Il est apparu d'une manière générale que l'adsorption des adénovirus par les cellules est très faible. Elle est proportionnelle au temps de contact cellules-virus et à la quantité de virus inoculée (DROUHET, 1957 - 75 ; BEALE et coll., 1957 - 23 ; PEREIRA et coll., 1959 - 264 ; PEREIRA, 1959 - 259). GINSBERG (1958 - 137) fait une étude détaillée du phénomène d'adsorption du virus par la cellule avec les types 1 à 4. Les réactions initiales de la cellule dépendent du nombre de particules qui peuvent s'associer à la cellule et de la vitesse de la réaction. La phase d'adsorption dure 5 à 6 heures environ, cependant avec les types 1 et 4 elle a pu être maximum en 4 heures. La quantité de virus adsorbée est très faible par rapport au nombre de cellules (environ 1 unité infectieuse pour 200 à 1.000 cellules). L'auteur n'a pas remarqué de différences notables si le volume d'inoculat varie ou si le nombre de cellules augmente. Pas de modification si on utilise une suspension de

cellules isolées ou une nappe cellulaire et si l'expérience est faite à + 4°C ou à la température du laboratoire, en présence d'eau distillée ou de solution saline tamponnée. La rotation des tubes de cellules n'augmente pas le taux d'adsorption. Dans toutes ces expériences l'expérimentateur a cherché le titre infectieux des milieux où se trouvaient les cellules en contact avec le virus.

Il a pu apprécier directement le taux d'adsorption virale par observation des modifications cellulaires visibles. Le temps nécessaire pour que 50 p. 100 des cellules présentent des altérations est sans doute en relation avec la quantité de virus adsorbée par les cellules. Il semble que les virus types 1 et 3 soient adsorbés plus rapidement que les types 2 et 4. L'adsorption pourrait commencer immédiatement après l'inoculation du virus et le maximum aurait lieu au moins 2 heures et plus probablement 4 à 6 heures après l'infection. Pendant cette période d'adsorption 75 p. 100 du virus total se trouve associé avec les cellules-hôtes.

Selon DENNY et coll. (1961 - 68) l'adsorption est complète en 6 heures pour les types 5, 6, 7 ou 14. FUKUMI et coll. (1957 - 127) étudiant l'adénovirus type 5, pense que l'adsorption du virus a eu lieu après 2 heures de contact cellules-virus.

JAWETZ et coll. (1958 - 178) étudiant le type 8 sur cellules HeLa, montrent qu'on a une faible proportion de virus infectant adsorbé sur les cellules jusqu'à 12 heures après l'infection. Ils mettent 80 DICT50 de virus en contact avec 160.000 cellules pendant des temps allant de 10 minutes à 4 heures. Une particule virale est adsorbée par 40.000 cellules. Une adsorption de 90 minutes semble optimum pour la production de lésions cellulaires.

Cette variation des temps d'adsorption du virus selon les types d'adénovirus est à comparer au temps d'adsorption pour les différents virus. C'est ainsi que pour le virus vaccinal le délai d'adsorption est 10 minutes, pour le virus poliomyélitique, il est de 30 minutes.

β — Définition de la phase de latence.

Le temps nécessaire pour voir se manifester la présence du virus dans la cellule est variable selon les types considérés et selon la quantité de virus introduite sur un nombre donné de cellules.

GINSBERG (1958 - 137) a montré que le pouvoir infectieux apparaît après une période de latence de 17 heures environ pour les types 1 et 2 et 14 à 15 heures pour les types 3 et 4. Selon FUKUMI et coll. (1957 - 127) la période de latence serait de 24 heures pour le virus type 5. BOYER et coll. (1959 - 38), DENNY et coll. (1961 - 68) montrent que la phase de latence est de 18 heures pour le type 5, 16 heures pour le type 6, 14 heures pour le type 7 et 19 heures pour le type 14. LIEBERMAN et coll. (1959 - 216) observent des délais comparables : 16 à 22 heures pour les types 1, 4, 5 et 6. Selon les auteurs, la phase de latence est liée au nombre de cellules infectées, au faible taux d'adsorption du virus sur les cellules HeLa ou à l'inoculat qui est susceptible de contenir une grosse quantité de particules virales non infectantes.

γ — Evolution de la fraction infectante.

LAGERMALM et coll. (1957 - 202) inoculent du virus type 5 à

des tubes de cultures de cellules HeLa à raison de $10^{7.2}$ DICT50. Ils effectuent des prélèvements dans des délais d'incubation variables : 6, 18, 24, 48 et 72 heures. Les liquides recueillis sont titrés. Les auteurs constatent qu'ils ont un titre maximum à 48 et à 72 heures après l'infection.

FUKUMI et coll. (1957-127) étudient l'infection des cellules HeLa par l'adénovirus type 5. Ils distinguent le matériel extracellulaire, c'est-à-dire le liquide de culture, et le matériel intracellulaire extrait des cellules infectées par désintégration au moyen de vibrations ultrasoniques à basse température suivie d'une centrifugation. La fraction extracellulaire ne permet pas de déceler de particules infectieuses après une incubation de 7 heures mais après 48 heures on obtient un titre faible. La fraction intracellulaire apparaît infectante après 24 heures.

LIEBERMAN et coll. (1959-216) étudient la production de matériel viral intracellulaire et extracellulaire avec les types 1, 4, 5 et 6 sur cellules HeLa. Les résultats obtenus traduisent des différences entre les types :

— Les cellules infectées avec 10^3 DICT50 de virus type 1, montrent une augmentation du virus infectant intracellulaire à 20 heures et un maximum de 72 heures. Le virus infectant extracellulaire apparaît 40 heures après l'infection et reste constant à partir de 42 heures. Le maximum d'altérations cellulaires s'observe à 72 heures, approximativement en même temps que le maximum de virus infectant intracellulaire.

— Si les cellules sont infectées avec $10^{2.5}$ DICT50 de virus type 4, le virus intracellulaire augmente à partir de 18 heures et atteint son maximum vers 36 heures.

— Si les cellules sont infectées avec $10^{4.5}$ DICT50 de virus type 5, le virus intracellulaire apparaît à partir de 16 heures et la fraction extracellulaire à 40 heures. Les modifications cellulaires sont maxima au moment du maximum du matériel infectant intracellulaire.

— Lorsque les cellules sont infectées avec $10^{2.5}$ DICT50 de virus type 6, le titre du virus infectant augmente de 16 à 22 heures après l'inoculation. Le virus extracellulaire est détecté à 40 ou 48 heures. Dans ce cas le maximum des modifications cellulaires est précédé par la production de virus infectant.

JAWETZ et coll. (1958-178) inoculent des cultures de cellules HeLa ou Maben avec l'adénovirus type 8 à raison de 80 DICT50 pour 200.000 cellules. Le virus intracellulaire apparaît entre 24 et 48 heures, pas de virus libre dans le surnageant. Dans certaines expériences on n'observe plus d'autre production de virus alors que dans d'autres on note entre 72 et 96 heures une deuxième production de virus qui est plus grande que la première. La désintégration cellulaire provoque l'apparition de virus libre dans le liquide. La production de matériel infectieux est fonction de la quantité de virus et de cellules. Avec 10 à 20 DICT50 de virus on obtient une dégénérescence de 75 p. 100 des cellules en deux jours si on a 50.000 cellules. On obtient les mêmes altérations cellulaires si on inocule 2 DICT50 de virus à 5.000 cellules.

L'étude du cycle de la multiplication virale est rendue difficile

par suite de la faible quantité de virus adsorbée sur les cellules, il est donc nécessaire d'utiliser une forte concentration de virus pour infecter le maximum de cellules. Dans ce cas les auteurs sont gênés par les effets précoces dûs à un autre phénomène. Pour cela PEREIRA et coll. (1959 - 266) traitent la suspension de virus type 5 par de la trypsine avant de l'introduire sur les cellules et effectuent des recherches d'une part sur la fraction intracellulaire et d'autre part sur la fraction extracellulaire.

Il résulte de nos travaux sur l'adénovirus type 5 que le virus est pris en charge par la cellule pendant la phase d'adsorption, une partie non adsorbée se retrouve inerte dans le milieu. Nous ne savons pas avec précision de quelle manière cette prise en charge du virus par la cellule peut se faire. Après un délai d'incubation cellules-virus de 2 ou 8 heures il n'y a pas de particules infectantes décelables dans les cellules (lecture des modifications cellulaires à 7 jours). Il semble cependant qu'il y ait présence d'une faible quantité de virus dans la cellule puisqu'une observation prolongée des cellules permet de déceler une faible quantité de particules virales, au moins lorsque le contact est de 2 heures. Lorsque le contact est de 8 heures, aucune particule virale infectante n'est décelable. Nous savons que le virus est dans la cellule puisqu'il sera décelable plus tard. Nous ne savons pas sous quelle forme il se trouve lié aux constituants cellulaires.

Après la phase de latence, vient la phase de la synthèse du virus au sein de la cellule. Tous les auteurs sont d'accord pour dire que cette période est très courte, elle atteint 5 à 9 heures. Ce sont les travaux de GINSBERG (1958 - 137), FUKUMI et coll. (1957 - 127), BOYER et coll. (1959 - 38 ; 1960 - 40), DENNY et coll. (1961 - 68). La quantité de virus produite par la cellule augmente progressivement pour atteindre un maximum vers 36 à 42 heures selon les types.

Nous avons pu voir que les particules infectantes extracellulaires ou bien extra et intracellulaires produites par les cellules infectées par l'adénovirus type 1 varient en quantité selon un processus diphasique. Ce phénomène se retrouve avec d'autres virus tels que le virus des oreillons (WOLFF, 1955 - 341), le virus vacuolant simien SV40 (HSIUNG et coll., 1962-173). Ce phénomène pourrait peut-être se rapporter à un état de disponibilité cellulaire d'où une production par vagues successives. Il est possible que les premières particules infectantes soient de nature chimique différente de la production qui a lieu par la suite. Il ne semble pas que nous puissions faire intervenir l'effet « toxique », car les conditions d'expériences sont telles que nous avons toujours travaillé avec de faibles doses de virus (10 à 40 DICT50). Il se peut que les particules infectantes nouvellement formées soient masquées par la production de matériel « toxique » dues à ces particules.

b) *Libération et rendement du virus :*

Les divers travaux effectuées sur les cellules infectées par les adénovirus montrent que les cellules retiennent le plus possible le virus qu'elles ont synthétisé. Ce sont les résultats exprimés par GINSBERG (1956 - 135). Reprenant une étude sur les adénovirus type 5, 6, 7 et 14, DENNY et coll. (1961 - 68) séparent la fraction cellulaire du surnageant. Ils observent une faible quantité de particules virales 30 heures après l'infection et vers 72 heures, une

quantité importante de particules virales se retrouve dans le milieu. La quantité de virus présente dans le milieu n'atteint jamais plus de 10 p. 100 du virus associé aux cellules. Ces résultats recoupent ceux que nous avons obtenus avec l'adénovirus type 5 infectant les cellules HeLa. Ainsi le rendement en virus est très faible par rapport à la quantité inoculée. GINSBERG (1958 - 137) rapporte les chiffres suivants, types 1 et 2 : 3,7 à 29 DICT50 par cellule, types 3 et 4 : 0,7 DICT50 par cellule. DENNY et coll. (1961 - 68) obtiennent un rendement de 34 DICT50 pour le type 5, 154 DICT50 pour le type 6, 5,7 DICT50 pour le type 7 et 0,39 DICT50 pour le type 14. LIEBERMAN et coll. (1959 - 216) trouvent pour les types 1, 2, 5 et 6 un rendement d'une DICT50 pour 200 ou 1.000 cellules. Selon PEREIRA (1958 - 258) le rendement moyen de l'adénovirus type 5 est 0,05 DICT50 par cellule à la 12^e heure après l'infection. Avec l'adénovirus type 8, JAWERTZ et coll. (1958 - 178) améliorent le rendement en particules virales si le contact cellules-virus est plus long.

A notre connaissance le développement de l'adénovirus sur cultures de cellules n'a pas encore été étudié après traitement de ces cultures par des hormones (cortisone) ou des radiations ionisantes (rayons X).

Le mécanisme de libération du virus par la cellule n'a pas pu être élucidé. Comme il reste très intimement lié à la cellule, la quantité de particules présentes dans le milieu est très faible et leur apparition dans le milieu extracellulaire est très tardive. Ce fait paraît important dans le cycle de synthèse du virus dans la cellule comme le souligne FUKUMI et coll. (1957 - 127). Il semble donc que la cellule s'embarrasse du matériel viral qu'elle a synthétisé par un mécanisme comparable à une sécrétion.

3) Valeur de la méthode employée.

L'introduction de suspensions virales plus ou moins diluées permet l'appréciation et la comparaison du pouvoir infectant. Cette observation est essentiellement basée sur la présence de modifications cellulaires facilement reconnaissables et typiques, à un faible grossissement, quel que soit le type d'adénovirus en cause. Ces modifications cellulaires globales représentent une manifestation de l'infectivité du virus. Nous avons pu montrer que le pouvoir infectant apparaît après la constatation de lésions cellulaires. Cependant il n'est pas douteux que la production de particules virales ait commencé avant que les altérations soient importantes et typiques. Cette méthode de titrage paraît grossière et limitée. Nous avons vu que l'erreur sur un titrage est voisine de 0,3 log₁₀. Il faut reconnaître cependant que ces titrages nous ont permis d'aborder une étude comparative sur la production du virus par la cellule qui n'est pas empirique.

Actuellement il est proposé une méthode plus précise permettant d'apprécier de très petites quantités de virus : c'est la méthode des « plages ». Elle a été utilisée avec succès pour les adénovirus par BONIFAS et coll. (1959 - 34), KJELLEN (1961 - 194), SHARPLESS et coll. (1961 - 307).

Cette méthode des « plages » est connue depuis longtemps. Elle a été mise au point par DULBECCO en 1952 (76). Elle est très

utilisée pour certains virus tels que les virus poliomyélitiques ou les virus coxsackie. Elle est de plus en plus employée pour l'étude des virus animaux. Cependant elle présente quelques difficultés de mise au point et pendant longtemps on a pensé que seuls certains virus pouvaient produire des « plages ».

BALDUCCI et coll. (1960 - 13) proposent d'utiliser une autre méthode faisant intervenir l'indice cytopathogène. Cet indice traduit les variations des lésions cellulaires en fonction du temps, contrairement à la DICT50 qui est une méthode statique faisant intervenir les lésions cellulaires observées à la fin de l'expérience.

KJELLEN (1957 - 193) propose une autre méthode très utilisée pour les virus poliomyélitiques : l'immunoinactivation faisant intervenir la neutralisation du virus par un immunosérum. Cette méthode est basée sur l'observation du temps nécessaire pour obtenir des lésions cellulaires à partir d'un mélange virus-sérum examiné en dilutions. Ce délai apparaît une fonction linéaire de la concentration en virus. Cependant cette technique n'a pas donné satisfaction avec les adénovirus. Il se produit une réactivation du virus après dilution du mélange et l'effet dilution est difficile à préciser.

4) Résumé.

Il est possible de retenir quelques idées principales de l'ensemble des travaux discutés.

a) Toutes les cellules qui peuvent être utilisées pour la multiplication des adénovirus n'ont pas la même sensibilité : les cellules épithéliales d'origine animale et humaine sont plus sensibles que les fibroblastes. Les fibroblastes présentent l'avantage de se conserver en bon état pendant un temps assez long (4 à 5 semaines). On a pu remarquer des variations dans la sensibilité des cellules selon les souches de virus, il arrive que certaines souches aient un comportement particulier. Les cellules les plus utilisées sont les cellules HeLa et les cellules de reins de singe. Les plus sensibles sont les cellules HeLa.

b) La réponse des cellules à l'agression virale est constante. C'est ainsi que les titres infectieux sont reproductibles d'une expérience à l'autre. L'erreur sur la DICT50 d'après Pizzi atteint 0,29 (lecture à 7 jours) à 0,32 (lecture à 10 jours) les conditions des titrages ayant été bien définies.

La durée d'observation des cellules paraît particulièrement importante, l'adénovirus ayant un développement relativement lent.

c) Le comportement des cellules en présence de différents types de virus paraît identique. Tous les types de virus provoquent des lésions cellulaires. Cependant on observe quelques différences. C'est ainsi que les types 8, 9 et 10 provoquent des altérations dans des délais très longs. L'adénovirus type 18 ne se multiplie que sur cellules de reins de singe. Dans quelques cas, pour les types 25 à 28, des passages aveugles sont nécessaires.

La quantité de particules infectantes produites varie selon les types de virus. Il se pose alors le problème de la constitution

chimique du virus selon les types considérés ou l'état de disponibilité de la cellule.

Les titres infectieux des suspensions virales préparées sont de l'ordre de $10^{-4,5}$ à 10^{-6} par 0,1 ml pour les types à dégénérescence rapide tels que les types 1, 2, 3, 5 ou 6 et $10^{-3,5}$ par 0,1 ml pour les types plus lents tels que les types 4 ou 7.

d) En présence de doses variables de virus, les cellules peuvent présenter deux types de modifications : des modifications précoces dues à un effet « toxique » et des modifications tardives en relation avec la multiplication du virus.

L'effet « toxique » serait dû à une forte quantité de virus ou à un matériel particulier présent dans la suspension virale. Les particules « toxiques » seraient séparables par centrifugation à haute vitesse des particules infectantes. On a pu identifier le matériel « toxique » comme une protéine. Cette protéine est détruite par la trypsine, stable à la chaleur, neutralisée par les anticorps homologues et non par les anticorps hétérologues, elle est stable après traitement par la ribonucléase et la désoxyribonucléase.

Une suspension virale soumise à une analyse par chromatographie ou par précipitation et diffusion dans le gel permet d'isoler 3 fractions A, B et C. La fraction B correspondrait à la fraction « toxique ». Elle serait constituée par une protéine β associée à la fraction C.

Les travaux utilisant la PFPA (p- fluorophénylalanine) comme inhibiteur de la synthèse virale montrent que la fraction « toxique » est inhibée. On peut donc penser que cette protéine « toxique » serait un précurseur du matériel viral.

e) La production de particules virales infectantes varie selon un processus qui paraît cyclique. La phase d'adsorption est variable selon les types de virus utilisés de 2 à 4 heures. La phase de latence peut être longue, elle varie de 16 à 22 heures. La phase de synthèse proprement dite est très courte. Elle dure de 4 à 6 heures. Il faut remarquer que les cellules ont tendance à conserver le matériel nouvellement synthétisé. Ce matériel apparaît comme un produit de sécrétion. On connaît mal le mécanisme par lequel il peut être libéré. Un fait est certain, il est difficile de le libérer et le rendement en virus par cellule est faible.

On peut se demander si le processus diphasique observé dans la production de virus n'est pas due à une infection par vagues successives ou si elle est due à la « disponibilité » des cellules.

f) La méthode des dilutions utilisées nous a permis d'établir des comparaisons entre les quantités de particules infectantes présentes dans les suspensions virales.

Cependant cette méthode n'est pas suffisamment précise pour détecter les faibles quantités de virus. Elle pourrait être avantageusement remplacée par la méthode des « plages » ou la détermination de l'index cytopathogène.

B. — METHODES FAISANT INTERVENIR LA PRODUCTION D'UN FACTEUR SOLUBLE ANTIGENIQUE SPECIFIQUE

1) Etude de la sensibilité et de la réceptivité cellulaire à l'agression virale.

a) Réponse des cellules :

Nous avons montré au cours de nos expériences que les cellules HeLa, T1, reins de lapin produisent une substance soluble, lorsqu'elles sont infectées par les adénovirus. La quantité de matériel soluble libérée varie selon les cellules utilisées : les cellules HeLa paraissent donner une production plus régulière.

Tous les auteurs sont d'accord pour dire que les cellules sensibles aux adénovirus, c'est-à-dire réagissant en présentant des altérations typiques, produisent une substance soluble décelable par la réaction de fixation du complément. Ce sont les travaux de ROWE et coll. (1953 - 293 ; 1955 - 294), HUEBNER et coll. (1954 - 175), HILLEMANN et coll. (1954 - 166 ; 1955 - 167), KJELLEN (1955 - 191), sur les premières souches d'adénovirus infectant des cellules épithéliales ou fibroblastiques, d'origine animale ou humaine.

b) Constance des cellules :

Nos résultats permettent de montrer que les cellules répondent de façon comparable d'une expérience à l'autre et d'un lot de virus à l'autre, aussi bien sur les cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5 que sur les cellules T1, infectées par l'adénovirus type 1 (voir tableaux 18, 20 à 24).

c) Comportement des cellules en présence des différents types de virus utilisés :

Nous avons pu montrer que tous les types d'adénovirus étudiés provoquent la production dans les cellules de facteur soluble en quantité sensiblement identique. Seul le type 8 donne des lésions cellulaires lentes et une faible quantité de matériel soluble et souvent anticomplémentaire, JAWETZ et coll. (1955 - 177). Il semble cependant que le matériel soluble soit produit avec régularité selon QUILLIGAN et coll. (1959 - 280).

La production de fraction soluble est un caractère commun à tous les adénovirus d'origine humaine ou animale. C'est un critère très utilisé pour l'identification des adénovirus humains ou animaux.

Il semblerait, selon PEREIRA (1956 - 256), BINN et coll. (1958 - 31) que l'on puisse faire une différenciation intratypique. BINN et coll. (1958 - 31) obtiennent des résultats intéressants avec les types 2, 3, 4 et 7.

FRIEDMAN et coll. (1959 - 126) étudiant les différences de résistance à la température du matériel soluble produit par les cellules avec les types 1 à 8, mettent en évidence 3 groupes : le groupe A comprenant les adénovirus types 1, 2, 5 et 6 résistant à 68°C à pH = 6 ; le groupe B comprenant les adénovirus types 3, 4 et 8 résistant à pH = 8 ; le groupe C représenté par l'adénovirus type 7 résistant aux différents pH et aux températures 70°C et

73°C. Les variations de pH dérivées des constantes thermiques des liquides contenant le matériel soluble ne sont pas identiques. On peut se demander si l'homogénéité immunologique apparente ne masquerait pas une variation au niveau moléculaire.

d) *Comportement des cellules en présence de doses variables de virus :*

Nos études ont permis de voir que les cellules mises en présence de doses variables de virus, répondent toujours en produisant le facteur soluble décelable par la réaction de fixation du complément. Si la quantité de virus mise en présence des cellules est faible les délais d'apparition du matériel soluble sont retardés et le titre est bas. KELLY et coll. (1957 - 188) remarquent qu'il n'y a pas de production de substance soluble par les cellules de reins de lapin lorsque la dose de virus est peu élevée. Selon HARTLEY et coll. (1956 - 159), il y aurait augmentation de la quantité de matériel soluble produite par les cellules, après passages en série du même type d'adénovirus, en augmentant le volume introduit ou en inoculant le culot résultant de la centrifugation sur centrifugeuse à heure vitesse SPINCO à 30.000 tours/minute pendant 4 heures 30 minutes.

Nous avons pu remarquer qu'une forte quantité de virus provoque une dégénérescence cellulaire rapide et une faible production de facteur soluble (voir tableau 26). Ainsi se trouve posé à nouveau le problème d'un effet « toxique ».

Divers travaux entrepris pour préciser la nature chimique de la substance soluble produite par les cellules après leur infection par un adénovirus, tendent à montrer qu'elle est constituée de particules différentes de celles qui provoquent les modifications cellulaires précoces.

Trois fractions non infectantes ont pu être identifiées par les techniques d'immunoélectrophorèse (PEREIRA et coll., 1959 - 265 ; PEREIRA, 1960 - 261), de chromatographie (KLEMPERER et coll., 1959 - 198 ; PHILIPSON, 1960 - 268 ; HARUNA et coll., 1961 - 161), de diffusion dans le gel (ALLISON et coll., 1960 - 3), de précipitation (STEINMAN et coll., 1959 - 316), représentées par A, B et C.

Nous avons vu que le phénomène « toxique » serait associé à la fraction B. Le matériel soluble est lié à A et à B. A est encore mal connu, mais serait spécifique de groupe. C serait spécifique de type. Selon ALLISON et coll. (1960 - 3), les facteurs A et C extraits des cellules contiennent de l'acide désoxyribonucléique. Ils sont résistants aux acides, à l'urée, aux enzymes protéolytiques ou à la désoxyribonucléase. Il semble que la fraction C existe avant précipitation ou électrophorèse car elle a une faible mobilité à pH = 8,4 vers la cathode alors que l'acide nucléique libre a une mobilité vers l'anode forte dans ces conditions. La fraction C garde son acide nucléique après action de la chaleur ou de la désoxyribonucléase tandis que la fraction A le perd.

PEREIRA (1960 - 261) a montré que le facteur B « toxique » serait un complexe formé d'une protéine sensible à la trypsine, β , et de la fraction C résistante à la trypsine. Après coloration des lignes de précipitation avec l'acridine orange, l'auteur a mis en évidence le composé γ commun aux fractions B et C, qui ne contiendrait pas d'acide désoxyribonucléique.

Par analogie avec le facteur LS de la vaccine de SMADEL et coll. (1942 - 309), les particules du matériel soluble et les particules provoquant les modifications cellulaires précoces, contiendraient un même motif moléculaire mais auraient une localisation différente. Il est difficile de dire si les constituants sont des composants de la particule infectante ou bien s'ils sont produits par les cellules. Les valeurs des points isoélectriques des particules infectantes et des particules solubles sont si rapprochées (respectivement 3,9 et 3,4) que STEINMAN et coll. (1959 - 316) se demandent si les particules solubles ne seraient pas une forme incomplète des particules infectantes. Un phénomène analogue a été observé par OSTER (1951-252) avec le virus de la mosaïque du tabac.

Les propriétés de la fraction soluble ont été étudiées à partir de suspensions virales par des procédés physiques : sédimentation, centrifugation, filtration et microscopie électronique. Les résultats obtenus par HILLEMANN et coll. (1955 - 167), ROWE et coll. (1955 - 294 ; 1958 - 297), KJELLEN (1955 - 191), BALDUCCI et coll. (1956 - 12), JAWETZ et coll. (1955 - 177) permettent de penser que les particules isolées ont une taille voisine de 3 à 4 m μ . Ces observations rejoignent celles de NAUDE et coll. (1954-245) qui estiment à 1,2 ou 5 m μ la taille des particules solubles de différents virus tels que la grippe, la rage ou des virus provoquant des encéphalites.

La résistance du matériel soluble produit par les cellules, à divers agents physiques ou chimiques est variable. La substance soluble est stable à -70°C ou à -30°C pendant des mois (GINSBERG, 1956 - 135 ; JAWETZ et coll., 1958 - 178). Un chauffage à 56°C ne semble pas altérer la fraction soluble si celui-ci n'excède par 2 heures (ROWE et coll., 1953 - 293 ; 1955 - 294 ; HUEBNER et coll. 1954 - 175 ; GINSBERG, 1956 - 135 ; BALDUCCI et coll., 1956 - 12 ; VEEN et coll., 1957 - 328 ; DOSSENA, 1961 - 74). Le matériel soluble est résistant aux variations de pH (GINSBERG, 1956 - 135 ; FRIEDMAN et coll., 1959 - 126), à l'éther, aux antibiotiques.

Selon FORSYTH et coll. (1958 - 122) il est possible de purifier et de concentrer au moins 100 fois la substance soluble produite par les cellules KB, infectées par l'adénovirus type 2, en la libérant des déchets de la cellule-hôte.

La perte de matériel infectant au cours de la séparation par chromatographie laisse supposer que la suspension de virus n'est pas homogène et que ses propriétés de surface sont difficiles à interpréter comme HENLE et coll. (1961 - 164) l'ont montré pour les Entérovirus.

WERNER (1956 - 337) tente d'étudier les particules solubles par l'intermédiaire des anticorps produits par injection de matériel viral à des cobayes. Des cobayes immunisés avec une suspension de virus type 3 donnent des sérums qui ne sont pas spécifiques du type 3 dans la réaction de fixation du complément. Ces sérums réagissent avec les suspensions virales type 7. Cela suppose que les particules virales sont contaminées avec la fraction soluble ou que la fraction spécifique de groupe fait partie des particules virales et se trouverait à leur surface.

PEREIRA (1960 - 260) montre que les adénovirus type 1, 2, 4,

5 et 6 libèrent un facteur capable de diminuer nettement la quantité de matériel soluble produite par les cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5. Le degré d'inhibition varie avec la dose du facteur utilisé. Il semble que ce facteur n'affecte pas la capacité des cellules d'absorber le virus.

WILCOX et coll. (1961 - 339) traitant les cellules HeLa par la PFPA (p-fluorophénylalanine) et FLANAGAN et coll. (1962 - 115) traitant les cellules par la 5-FUDR (5-fluorodésoxyuridine) inhibent à certains stades la synthèse du DNA viral. Ils observent que l'inhibition de la fraction soluble a lieu en même temps que l'inhibition du matériel « toxique » et infectant. Ces 3 fractions pourraient représenter les précurseurs du matériel viral.

De plus WILCOX et coll. (1961 - 340) montrent qu'il y aurait une augmentation de protéines en même temps qu'une augmentation de DNA. Une partie des protéines constituerait le matériel soluble spécifique du virus. Des études détaillées sur la séparation et la purification des différentes fractions indiquent qu'il est possible de reconnaître au moins 3 protéines distinctes : une protéine spécifique du groupe adénovirus, une protéine « toxique » et une protéine spécifique de type.

2) Cinétique de la réponse cellulaire quel que soit le type d'adénovirus.

a) *Notion d'une évolution de type cyclique :*

Les études sur la production de matériel soluble après des délais variables de contact cellules-virus nous conduisent à la notion d'une évolution d'un type cyclique.

Selon LAGERMALM et coll. (1957 - 202) le facteur soluble apparaît dans les cellules HeLa vers 48 heures après l'infection avec l'adénovirus type 5. Le titre obtenu à 48 heures semble maximum. Ces auteurs ont étudié le matériel soluble intra et extracellulaire réunis.

FUKUMI et coll. (1957 - 127) observent l'apparition du facteur soluble dans les cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5 vers 31 heures à un titre faible. Le titre est beaucoup plus élevé 48 heures après l'infection.

LIEBERMAN et coll. (1959 - 216) notent des différences dans le cycle du développement de la fraction soluble selon les types d'adénovirus.

Avec l'adénovirus type 1 le facteur soluble extracellulaire apparaît 44 heures après l'infection et augmente jusqu'à 120 heures. Le facteur soluble est présent dans la fraction intracellulaire dès 20 heures après l'infection et est maximum à 72 heures.

L'adénovirus type 4 permet de déceler la fraction soluble intracellulaire dès 18 heures après l'infection, elle est maximum à 50 heures. Ce matériel soluble se retrouve dans la fraction extracellulaire à 36 heures.

Les cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5 produisent du matériel soluble 19 heures après l'infection. La fraction extracellulaire permet de déceler le matériel soluble aux environs de 40 heures.

Avec l'adénovirus type 6, le matériel soluble est décelable dans la fraction intracellulaire 20 heures après l'infection et dans la fraction extracellulaire 65 heures après l'infection.

Les cellules ont été infectées avec de fortes doses de virus 300 à 10.000 DICT50 selon les types.

Selon CORSELLO et coll. (1961 - 53) le matériel soluble n'apparaît pas avant 48 heures dans la fraction cellulaire et 72 heures dans la fraction extracellulaire, avec l'adénovirus type 4. L'allure des courbes traduisant les variations de la quantité de fraction soluble est voisine de celles que nous avons donné avec l'adénovirus type 5.

L'adsorption de l'adénovirus paraît maximum en 4 à 6 heures selon les travaux de LIEBERMAN et coll. (1959 - 216), de HARTLEY et coll. (1956 - 158), de FUKUMI et coll. (1957 - 127).

La période de latence pour que le matériel soluble soit décelable dans la cellule est de 16 à 20 heures selon les types considérés. La synthèse du virus dans la cellule augmente rapidement de 20 à 48 heures.

b) *Libération et rendement du virus :*

Un aspect important de la multiplication du virus dans la cellule est la libération du facteur soluble nouvellement synthétisé. Il est difficile de le libérer, il faut faire intervenir l'éclatement de la cellule par des procédés mécaniques : broyage, ultrasons ou congélation et décongélation successives.

Le rendement des cellules en matériel soluble paraît beaucoup plus important que le rendement en particules infectantes. Il est possible d'obtenir de hauts titres après une infection de 3 à 5 jours.

Nos résultats traduisant la cinétique de la production de facteur soluble par les cellules T1, reins de lapin ou HeLa infectées par les adénovirus type 1 ou 5 sont en accord avec les résultats indiqués par les auteurs.

Nous avons montré qu'un contact cellules-virus de 2 à 4 heures est suffisant pour permettre l'adsorption du virus sur les cellules puisqu'il y a production de matériel soluble. Le facteur soluble extracellulaire apparaît dans les cellules T1 en 48 à 66 heures ou les cellules de reins de lapin en 81 à 96 heures. Il semble exister un processus diphasique dans l'évolution de la quantité de substance soluble.

Le même phénomène se reproduit si nous cherchons l'évolution de la substance intra et extracellulaire.

L'existence de ce phénomène est difficile à interpréter. On pourrait peut-être l'expliquer par l'état de « disponibilité » des cellules au moment de l'infection. La production de matériel soluble serait liée à la quantité de cellules infectées au même moment. Si l'infection des cellules a lieu par vague, la production de matériel soluble aurait lieu également par vague.

Il se peut aussi que le matériel libéré dans le milieu se trouve détruit ou masqué par un autre produit cellulaire.

On peut encore penser qu'il y a destruction d'un matériel soluble produit pendant la période précoce, de constitution chimique différente du matériel soluble libéré à la fin du cycle. Ce matériel soluble précoce et final, bien que de nature différente serait capable de réagir de manière spécifique.

Il semble difficile d'admettre qu'il y ait eu des effets dits « toxiques » car les doses de virus utilisées dans cette étude cinétique sont faibles : 10 à 40 DICT50 pour 100.000 cellules.

On trouve dans une étude de FEBVRE et coll. (1957 - 109) la notion de l'apparition dans les cultures de cellules de testicules de jeunes lapins infectées par le virus du fibrome de Shope, d'un matériel soluble pendant la phase muette intracellulaire du virus et avant l'apparition de virus corpusculaires.

De même dans l'étude de WOLFF (1955 - 341) sur la production de matériel soluble du virus ourlien et dans celle de BLACK (1959 - 32) sur le matériel soluble présent dans les cellules en cultures infectées par le virus de rougeole, on voit une courbe paraissant traduire un phénomène analogue à celui que nous avons observé.

Nos résultats sur la production de matériel soluble intracellulaire et extracellulaire avec les cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5 sont en accord avec ceux des auteurs. Le facteur soluble apparaît dès 24 heures après l'infection dans la fraction intracellulaire et à 72 heures dans la fraction extracellulaire. La libération de la substance soluble est difficile et faible. La même résultat se retrouve au cours de l'étude de la production de matériel soluble libéré chaque jour par les cellules T1 infectées par l'adénovirus type 1. Les essais d'extraction de la fraction soluble produite par les cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 7 montrent bien que la cellule accumule les produits qu'elle a synthétisés tel que le matériel soluble responsable de la fixation du complément.

D'après les travaux de LIEBERMAN et coll. (1959 - 216), il semblerait que les particules solubles soient des sous produits de la multiplication des particules infectantes.

3) Valeur de la méthode employée.

La méthode de détection de la production de matériel soluble est très utilisée parce qu'elle est facile et rapide. Cependant elle demande à être exécutée de manière systématique.

C'est ainsi que le sérum humain utilisé comme référence et contenant les anticorps spécifiques du groupe adénovirus a un titre moyen de 7,2 (sur 15 expériences, son titre atteint 12 fois 7 et 3 fois 8). Il est admis que la réaction est valable lorsque le titre du sérum ne varie pas plus d'une dilution en plus ou en moins (une unité).

L'utilisation des unités logarithmiques (dilution 1/2 en 1/2) comme BOYD (1958 - 35) l'a déjà proposé, nous a permis d'établir des comparaisons quantitatives. Il est aussi possible de combiner l'appréciation du titre du sérum et le titre de la suspension virale intervenant comme antigène (voir règle énoncée page 37).

La réaction de fixation du complément est cependant imprécise dans l'appréciation de faible quantité de substance soluble, ce qui laisse à penser que nos résultats pèchent par défaut.

4) Résumé.

Les études portant sur la fraction soluble permettent de dégager les faits suivants :

a) Toutes les cellules sensibles aux adénovirus, c'est-à-dire présentant des altérations typiques lorsqu'elles sont soumises à leur agression, produisent un facteur soluble décelable par la réaction de fixation du complément.

Il semble que les cellules HeLa soient les plus sensibles.

b) Les cellules produisent la même quantité de matériel soluble quel que soit le type de virus en cause. Cependant l'adénovirus type 8 semble provoquer la production d'un facteur soluble anticomplémentaire.

Au cours des études, il apparaît qu'une différenciation intratypique soit possible. L'homogénéité immunologique apparente masquerait une variation au niveau moléculaire.

c) Il apparaît que la réponse cellulaire à l'agression virale par la production de facteur soluble soit constante. La même suspension virale infectant les cellules dans les mêmes conditions, provoque la production d'une même quantité de matériel soluble.

d) L'introduction de doses variables sur les cellules conduit à l'observation de 2 sortes de lésions cellulaires : les lésions précoces caractéristiques de l'effet « toxique » ne s'accompagnent pas de production de facteur soluble ; et les lésions tardives correspondant à la phase de multiplication du virus, accompagnées de production du matériel soluble.

Il a été possible de séparer les particules solubles par centrifugation à 30.000 tours/minute pendant 4 heures 30 minutes, elles se retrouvent dans le surnageant et les particules infectantes dans le culot.

L'analyse chromatographique et par précipitation et diffusion dans le gel de suspensions virales ont permis d'identifier 3 fractions A, B et C. La fraction B serait protéique et responsable de l'effet « toxique », elle ne contiendrait pas d'acide nucléique. Les fractions A et C contiendraient du DNA. La fraction A représente le matériel soluble.

Différentes études faites au microscope électronique, par centrifugation ou par filtration ont permis de connaître la taille des particules solubles. Elle varie de 3 à 4 m μ .

Il apparaît que les particules solubles sont résistantes à la température, aux variations de pH, aux antibiotiques. Il est possible de purifier et de concentrer le matériel soluble.

L'utilisation de la 5-FUDR (5-fluorodesoxyuridine) comme inhibiteur de la synthèse de DNA a permis de montrer que la production de facteur soluble est inhibée en même temps que celle

du DNA. On peut penser que le matériel soluble est un précurseur du matériel viral.

e) L'apparition et l'évolution de la fraction soluble dans les cellules infectées évoquent une évolution de nature cyclique.

Le facteur soluble produit est décelable après les premières modifications cellulaires constatées. La période d'adsorption varie de 2 à 4 heures selon les types. La phase de latence dure de 16 à 24 heures après l'infection. La phase de synthèse paraît courte. Le processus de production semble diphasique. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'infection des cellules par vagues successives ou par l'état de disponibilité dans lequel se trouvent les cellules lorsqu'elles rencontrent le virus.

Le rendement en particules solubles après infection des cellules est plus élevé que celui en particules infectantes. Il est fréquent d'utiliser des suspensions virales à la dilution 1/16 dans les réactions de fixation du complément.

Le mécanisme de libération des particules solubles est mal connu. Nous avons vu qu'il faut utiliser des moyens brutaux tels que le broyage à haute vitesse ou des séries de congélations et décongélations successives pour les libérer. Il semble que les particules soient produites par un mécanisme analogue à une sécrétion et qu'elles soient retenues à l'intérieur de la cellule.

f) La réaction de fixation du complément utilisée nous a permis d'établir une comparaison dans les réponses des différentes cellules aux divers types de virus. L'introduction d'unités logarithmiques dans les concentrations en sérums et dans les concentrations de matériel soluble (voir règle page 37) a permis une étude comparative plus complète.

C. — AUTRES METHODES INDIRECTES UTILISABLES

Certains virus ont la propriété de provoquer l'agglutination des hématies sur lesquelles ils se sont fixés. Nous allons voir dans quelles conditions cette propriété est utilisable pour l'étude des adénovirus. Il y a lieu de distinguer 3 cas :

- 1) L'hémagglutination « directe » d'hématies,
- 2) L'hémadsorption ou fixation des hématies sur les cellules infectées,
- 3) l'agglutination par un sérum antiadénovirus d'hématies ayant été traitées puis mises en contact avec un liquide provenant de la culture d'adénovirus sur cellules sensibles (on pourrait l'appeler hémagglutination « indirecte »).

1) Hémagglutination directe.

Pour les adénovirus, elle a été observée, semble-t-il pour la première fois par HULL et coll. (1956 - 174) avec une souche d'origine simienne type M₁. Les suspensions virales provenant de ce type de virus agglutinent les hématies de poulet, de singe et les hématies humaines du groupe 0. ROSEN (1958 - 288) constate que les milieux des cellules infectées par des adénovirus pouvaient

présenter une hémagglutination directe avec les hématies humaines, celles de rhésus, de souris blanche, de rat. Mais les hématies de poulet, de chimpanzé, rat de coton, vache, furet, chien, cobaye, hamster, cheval et mouton n'ont pas donné le phénomène d'hémagglutination. Certains types d'adénovirus agglutinent les hématies humaines : types 8, 9, 10 et 13, d'autres les hématies de singe rhésus : types 3, 7, 7a, 13, 14, 15 et 16 ; d'autres agglutinent les hématies de singe grivet : types 3, 7, 7a, 13, 15 et 16 ; d'autres les hématies de souris : types 8, 9, 10, 13, 15 et 17 et presque tous les types agglutinent les hématies de rat. Les travaux qui ont suivi ceux de ROSEN (1958 - 288) utilisent essentiellement les hématies de singe rhésus et les hématies de rat, les hématies humaines du groupe 0 apportent peu de renseignements.

ROSEN et coll. (1961 - 290), BELLELLI et coll. (1961 - 2), WIGAND et coll. (1962 - 338) montrent que les adénovirus peuvent se classer en trois groupes :

1) les types d'adénovirus qui agglutinent les hématies de rat (les types 9, 10, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27 de façon constante et les types 2, 4, 5, 6, 8 irrégulièrement) ;

2) les types d'adénovirus qui agglutinent les hématies de singe rhésus (types 3, 7, 11, 14, 16, 20, 21, 25 et 28) ;

3) les types d'adénovirus qui n'agglutinent ni les hématies de rat, ni les hématies de singe (types 1, 12 et 18).

Selon ROSEN (1960 - 289) il semble que l'hémagglutination fournisse des « marqueurs » tels que la spécificité des hématies agglutinées, la température optimum de la réaction. On peut établir des sous-groupes parmi les types d'adénovirus qui agglutinent les hématies de singe rhésus :

- 1) sous groupe comprenant les types 1, 2, 5 et 6 ;
- 2) sous groupe comprenant les types 8 et 9 ;
- 3) sous groupe comprenant les types 3, 7 et 14 ;
- 4) sous groupe comprenant les types 11 et 16.

La spécificité du test d'agglutination est prouvée par l'inhibition d'hémagglutination par un sérum contenant des anticorps pour le type d'adénovirus considéré. La réaction est spécifique de type.

On sait qu'il existe des variations antigéniques à l'intérieur d'un même type d'adénovirus, par exemple les types 7 et 7a (ROWE et coll. (1958 - 296)). Cette différence est décelable par neutralisation mais ne l'est pas par l'inhibition d'hémagglutination.

ZUSCHEK (1961 - 344) fait une étude sur l'hémagglutinine des adénovirus en fonction du singe donneur, des cellules utilisées pour la culture du virus type 3 et des délais d'incubation cellules-virus.

Il observe des variations des taux d'hémagglutination de suspensions virales liées aux donneurs. Les hématies de singe grivet paraissent mieux agglutinées que les hématies de singe rhésus. Les cellules HeLa produisent plus d'hémagglutinines que les cel-

lules de reins de singe. On observe une hémagglutination nette dans la fraction extracellulaire plus tôt que dans les cellules. Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus pour les autres virus. Cette différence reflète peut être la sensibilité du test ou bien les délais d'apparition des modifications cellulaires décelables.

La fraction hémagglutinante de la suspension virale a pu être séparée par centrifugation à haute vitesse 36.000 à 39.000 tours/minute pendant 3 heures (PRIER et coll., 1958 - 274 ; ZUSCHEK, 1961 - 344). A cette vitesse la fraction hémagglutinante sédimente tandis que la fraction soluble intervenant dans la réaction de fixation du complément se trouve dans le surnageant.

KASEL et coll. (1960 - 184 ; 1960 - 185) utilisant des hématies humaines 0 observent une agglutination avec les types d'adénovirus 8, 9, 10 13 et 15. Ils étudient les propriétés du récepteur des hématies. L'hémagglutination n'a pas lieu lorsque les cellules sont traitées par l'enzyme du *Vibrio cholérique* (RDE). Elle est nettement diminuée lorsque les hématies sont mises en présence de virus grippal A et B. Selon les auteurs, on trouve dans les suspensions virales des 5 types d'adénovirus énumérés un facteur qui inhibe partiellement ou totalement l'agglutination appelé ERM, c'est le facteur qui modifie le récepteur de l'hématie. Ce facteur est distinct de la particule virale infectant et a pu être séparé par centrifugation à haute vitesse (3 fois 40.000 tours/minute pendant 1 heure 30 minutes). Ce facteur ERM est présent dans le surnageant alors que les particules infectantes sont dans le culot. Il y aurait donc une différence de taille importante entre ces particules.

Poursuivant leurs recherches sur le facteur modifiant le récepteur des hématies, KASEL et coll. (1961 - 186) montrent que les adénovirus types 1, 2, 4 et 15 contiennent un facteur non dialysable, séparables des particules virales et capables de modifier les récepteurs des hématies humaines empêchant l'hémagglutination des types 10, 13 et 15. Ce facteur est spécifique de type comme le prouve le test d'inhibition faisant intervenir les sérums spécifiques de type.

Ce facteur n'est pas assimilable au facteur soluble intervenant dans la réaction de fixation du complément. Plusieurs faits tendent à le prouver : il est produit seulement par quelques types d'adénovirus, il est résistant à la trypsine. Il est différent de la fraction C car il n'est pas produit par l'adénovirus type 5. Il est différent de la fraction B, du facteur détachement cellulaire ou du facteur responsable des lésions cellulaires précoces. Ce facteur n'est pas modifié par l'action de la désoxyribonucléase, ni par celle de la ribonucléase, de la trypsine, de la chymotrypsine, de l'éther et des rayons ultraviolets.

Ce facteur ERM est une substance macromoléculaire thermolabile et se comporte comme un enzyme. Le degré de destruction du récepteur varie en fonction de la température et du temps de contact. Son mécanisme d'action serait différent de la neuraminidase présente chez les Myxovirus. Le facteur ERM des adénovirus n'altère pas la capacité des hématies à agglutiner les Myxovirus. Les adénovirus types 1 et 2 ne contiennent pas de neuraminidase. Les enzymes du *Vibrio cholérique* et de la grippe

détruisent les récepteurs des hématies humaines pour l'agglutination des virus types 8 et 9 tandis que le facteur ERM ne modifie pas les récepteurs pour ces types.

Le phénomène d'hémagglutination observé avec les adénovirus apparaît donc différent de celui rencontré avec la grippe.

Son mécanisme apparaît également différent de celui des Entérovirus tel que le virus écho (BARRAL, 1962 - 15). En effet les récepteurs du virus écho sur l'hématie sont sensibles à la chymotrypsine mais ne sont pas détruits par l'action de la trypsine ou de la neuraminidase.

ANDERSON (1954 - 4) reconnaît 3 groupes de virus hémagglutinants. Un premier groupe est constitué par les Myxovirus dans lequel les particules virales sont les agents hémagglutinants et transportent un enzyme, la neuraminidase qui permet l'élution et la destruction des récepteurs des hématies. Dans un deuxième groupe, se classent les virus dont la particule est considérée comme hémagglutinante mais ne possède pas d'enzymes d'élution et ne produisent pas la destruction du récepteur. Ce sont les virus d'Arthropodes, les virus d'encéphalomyocardite ou les virus poliomyélitiques. Enfin dans un troisième groupe se trouvent les virus qui au cours de la croissance cellulaire produisent une particule hémagglutinante différente de la particule virale. Ce sont les virus de la vaccine, de la variole, de la psittacose.

Il semble bien que les Adénovirus puissent se rattacher à ce troisième groupe. L'étude de l'hémagglutination pourrait apporter sa contribution à la connaissance de la multiplication des adénovirus dans les cellules.

2) Hémadsorption.

L'hémadsorption correspond à l'attachement sélectif des hématies sur la surface de la nappe cellulaire. SHELOKOV et coll. (1958 - 308), ayant réussi à isoler et à identifier certains virus tels que la grippe, le virus CA ou la vaccine, appliquent cette technique à des cellules infectées par des adénovirus. Les auteurs n'observent pas de fixation avec les hématies de poule, de cobaye, de mouton ou les hématies humaines pour les types 1, 2, 4, 6, 7 et 8.

3) Hémagglutination indirecte.

Elle a été réalisée par FRIEDMAN et coll. (1957 - 125), Ross et coll. (1958 - 292), SQUERI et coll. (1960 - 315). Ces auteurs utilisent la méthode de BOYDEN (1951 - 36) pour la sensibilisation des hématies de mouton par l'acide tannique. Les hématies peuvent adsorber une fraction présente dans les suspensions de virus types 1, 2, 3 et 4 et devenir agglutinables par les sérums provenant d'animaux immunisés contre ces types de virus et par les sérums humains provenant de sujets ayant été infectés. En soumettant les suspensions virales à une centrifugation à haute vitesse, on constate que les hématies adsorbent une fraction soluble. PRIER et coll. (1958 - 274) travaillant sur les suspensions de virus types 3, 4 et 7 retrouvent des résultats comparables.

4) Conglutination.

PRIER et coll. (1958 - 274) ont effectué le test de conglutination comparativement au test d'hémagglutination indirecte et de fixation du complément. Le test de conglutination repose sur l'adsorption du complément conglutinant. Le complément conglutinant est apporté par du sérum de cheval.

Les résultats obtenus par le test de conglutination sont plus élevés que par la réaction de fixation du complément. Bien que ce test paraisse plus sensible, il est peu utilisable couramment, car il nécessite un système de dilutions bien ajustées.

5) Test de précipitation et de diffusion dans le gel.

PEREIRA et coll. (1959-259) ont mis au point une technique de précipitation et diffusion dans un gel. Cette réaction donne des résultats très comparables à ceux obtenus par la réaction de fixation du complément. Elle est spécifique de type. Cette réaction met en évidence les fractions A, B et C à partir de la suspension virale.

L'utilisation de cette technique a permis à HELLER et coll. (1960 - 162) et à CARMICHAEL et coll. (1961 - 44) d'établir la relation antigénique entre le virus de l'hépatite infectieuse du chien et les adénovirus déjà connus.

6) Résumé.

Il ressort de l'ensemble des travaux sur l'hémagglutination indirecte, la conglutination et les réactions de fixation du complément, que les 3 fractions antigéniques sont différentes de la particule virale responsable de l'infection.

Les particules hémagglutinantes apparaissent comme des constituants particuliers de la particule virale. Elles sont séparées par centrifugation à 36.000 ou 39.000 tours/minute pendant 3 heures. Elles se retrouvent dans le culot. L'hémagglutinine est détruite par le RDE et diminuée lorsque les hématies sont préalablement traitées par le virus grippal A ou B. On trouve dans la suspension virale un facteur ERM modifiant le récepteur de l'hématie. Il est possible de séparer ce facteur par 3 centrifugations à 40.000 tours/minute pendant 1 heure 30 minutes. Ce facteur apparaît spécifique de type, il n'est pas modifié par l'action de la ribonucléase, de la trypsine, de la désoxyribonucléase, de la chymotrypsine, de l'éther ou des ultraviolets. Il se comporte comme un enzyme et apparaît différent de la neuraminidase.

L'hémagglutination directe semble facile à réaliser et paraît intéressante dans l'étude des adénovirus.

Le test de précipitation et de diffusion dans le gel pourrait apporter sa contribution dans certaines recherches sur les adénovirus.

TROISIÈME PARTIE

REACTIONS DE LA CELLULE AU COURS DE L'AGRESSION VIRALE

Nous avons examiné les réactions de la cellule lorsqu'elle est soumise à une agression par l'adénovirus en utilisant des méthodes statiques et dynamiques.



CHAPITRE I

RESULTATS ACQUIS PAR LES METHODES STATIQUES

Trois méthodes d'observation sont retenues : l'examen des cellules vivantes, l'examen des colorations morphologiques et l'examen des colorations cytochimiques. Les deux premières méthodes appartiennent au même groupe des études morphologiques. Ce sont elles que nous envisagerons maintenant.

I. — RESULTATS.

A. — ETUDES MORPHOLOGIQUES

Nous pensons qu'il est très important de définir dans quelles conditions les cellules sont étudiées sous l'angle morphologique. L'expérience montre en effet qu'on peut arriver à une grande précision dans l'estimation des altérations cellulaires par le bon emploi d'un microscope à faible grossissement. L'expérience montre aussi que l'emploi d'un objectif à immersion, loin de faciliter les choses, les complique à cause des variations de la morphologie fine des lésions même spécifiques ainsi que nous le verrons plus loin.

Ainsi les études morphologiques comprendront des observations soit au microscope à contraste de phase « in vivo » soit de préparations fixées colorées. Au contraste de phase, le faible grossissement permet l'examen de la population cellulaire et le fort grossissement celui d'une cellule donnée.

1) Examen « in vivo » au faible grossissement.

L'examen des cellules est effectué au grossissement 20 environ, directement à travers le verre. Il a pu être fait sur cellules HeLa, cellules de rein humain en lignée continue (souche T1), cellules de reins de lapin en primo-culture et cellules amniotiques humaines.

a) *Les cellules HeLa :*

Les cellules HeLa infectées par les adénovirus types 1 à 17, ont tendance à devenir rondes, ballonnées, réfringentes (c'est le stade +) ; puis elles prennent une teinte jaune, les cellules ont tendance à former des agrégats (stade ++) ; puis chaque cellule s'individualise au sein du groupe (stade +++) et les cellules commencent à se détacher du verre. Enfin toutes les cellules paraissent lésées (stade ++++) et tombent dans le milieu de culture.

Les altérations cellulaires peuvent apparaître dans des délais variables : 18 heures à 4 jours et dans quelques cas 8 à 10 jours. Il arrive que les cellules lésées restent collées au verre pendant un certain temps. Cet aspect paraît propre aux cellules HeLa.

Certains types de virus provoquent une dégénérescence cellulaire rapide : ce sont les types 1, 2, 3, 5, 6, 11 et 12 qui donnent

des suspensions virales à titres élevés. D'autres types provoquent une dégénérescence cellulaire moins rapide, ce sont les types 4, 7 et 14 essentiellement dont les suspensions virales préparées ont des titres un peu plus bas. D'autres encore donnent des dégénérescences lentes : ce sont les types 9, 10, 13, 15 et 17. Enfin le type 8 provoque les dégénérescences les plus lentes et le titre infectieux des suspensions virales préparées est très bas, voisin de zéro.

Lorsque les altérations cellulaires sont très précoces, 12 à 18 heures après l'infection, l'allure des cellules est différente. Elles s'arrondissent, s'isolent les unes des autres puis tombent dans le milieu de culture. On peut se demander si ce phénomène ne correspond pas à l'effet « toxique » dont nous avons parlé. L'examen plus approfondi au faible grossissement sera effectué, en même temps que l'examen au fort grossissement, car il est la base de référence.

b) *Les cellules T1 :*

On retrouve les mêmes stades que ceux décrits pour les cellules HeLa. Lorsque les cellules T1 sont infectées par les adénovirus types 1 à 17, elles présentent d'abord à 48 heures une rétraction de la nappe qui prend un aspect de réseau à mailles (stade +). Puis à 4 jours les cellules s'isolent les unes des autres, s'arrondissent et deviennent jaunes (stade ++). Plus tard, à 7 jours, elles forment des agrégats (stade +++) et certaines commencent à tomber. La chute totale des cellules a lieu entre 7 et 14 jours.

Les cellules T1 lésées tombent plus facilement dans le milieu de culture que les cellules HeLa, même lorsque la dégénérescence est ++++.

Il arrive que les cellules T1 infectées avec de fortes doses de virus présentent des altérations précoces : la nappe cellulaire se rétracte en 24 heures et au sein de la nappe on remarque quelques cellules rondes. Les cellules tombent entre 24 et 48 heures.

Quelquefois, les cellules s'individualisent nettement, prennent des contours flous en 24 heures puis tombent dans le milieu de culture quelques heures plus tard.

Ainsi se trouve posé de nouveau le problème de l'effet « toxique ».

c) *Cellules amniotiques humaines :*

Les adénovirus types 1 et 5 ont été essentiellement étudiés. Quelques cellules isolées s'arrondissent à la périphérie de la nappe cellulaire. Ces cellules prennent des contours nets, elles deviennent réfringentes mais leur contenu est diffus (stade + vers le 5^e ou le 7^e jour). Puis les cellules lésées se groupent pour former des amas (stade ++ ou +++ vers le 10^e jour). Enfin toutes les cellules prennent un contour flou, le cytoplasme est granuleux et certaines se détachent du verre.

Il arrive que des cellules infectées par de fortes doses de virus présentent des modifications précoces en 48 heures : quelques cellules isolées au sein de la nappe s'arrondissent, deviennent très réfringentes et tombent à 48 heures dans le milieu de culture.

Nous pouvons nous demander s'il ne s'agit pas d'effet « toxique ». Il faut remarquer que ce phénomène est plus rare sur les cellules amniotiques.

d) *Cellules de reins de lapin :*

Nous avons étudié particulièrement les types 1, 5 et 11. Quelques cellules isolées, rondes et réfringentes apparaissent à la périphérie de la nappe cellulaire (stade + à 4 jours). Le nombre de ces cellules rondes augmente au sein de la nappe. Les cellules lésées sont groupées en grappe (stade ++ ou +++ à 7 jours). Puis les cellules altérées prennent un contour flou et le cytoplasme est granuleux, elles ont tendance à se détacher du verre vers le 14^e jour environ.

Il semble que la dégénérescence des cellules de reins de lapin soit lente et qu'il y ait peu d'effet « toxique » visible.

L'adénovirus type 7 ne nous a pas permis d'avoir des lésions cellulaires.

Les modifications cellulaires observées au faible grossissement après infection par les adénovirus sont spécifiques. Elles sont différentes de celles obtenues après infection par d'autres virus tels que les virus poliomyélitiques, le virus de l'herpès ou les Myxovirus.

2) **Examen « in vivo » au fort grossissement.**

Au microscope à contraste de phase, dans la cellule normale, les nucléoles apparaissent comme des masses noires au sein du noyau. Vingt-quatre heures après l'infection, on remarque quelques zones grises périnucléolaires. Puis ces zones grises ont tendance à se réunir pour former une masse granuleuse. Les nucléoles sont repoussées à la périphérie. Les nucléoles, le plus souvent homogènes, présentent fréquemment des aspects de vacuolisation sous forme de zones circulaires de moindre densité comme taillés à l'emporte-pièce. Vers 48 heures, il apparaît un espace clair entre la masse granuleuse et la membrane nucléaire qui se festonne. C'est dans cet espace clair que se forment les cristaux enserrant généralement la masse centrale. Les cristaux apparaissent le plus souvent très brutalement. Ils peuvent être gros et courts, à pointe effilée, ou au contraire relativement longs et de section polyédrique.

En examinant avec un dispositif à contraste de phase interférentiel ces cristaux apparaissent en relief avec des lignes très nettes.

Lorsque les cellules présentent peu de lésions, elles sont bien étalées et l'observation du cytoplasme est aisée. Les mitochondries des cellules T1 sont normalement courtes et très fines. A la période tardive de l'infection, mais déjà semble-t-il lorsque les premières zones grises apparaissent dans le noyau, elles gonflent, deviennent plus denses, ont tendance à s'arrondir et à s'accumuler de part et d'autre du noyau.

Des cellules amniotiques infectées par l'adénovirus type 5 présentent des modifications analogues à celles observées sur cellules T1. Vers 38 heures on remarque au contraste de phase,

« in vivo », un réseau gris entre les nucléoles constitué par de petites masses qui forment par la suite une masse centrale de structure alvéolée. On reconnaît un espace clair entre la masse centrale et la membrane nucléaire où s'accumulent vers 56 à 80 heures des cristaux. Ces cristaux sont plus petits, que dans les cellules T1, et polyédriques.

3) Examen au fort grossissement après coloration.

a) *Lésions morphologiques spécifiques :*

Nos études ont porté sur l'adénovirus type 5, provenant du lot 5-912 (5^e passage) ou du lot 5-985 (6^e passage). Ces suspensions de virus sont introduites sur des cellules de rein humain T1 en lignée continue à raison de 1.000 DICT50 pour une population de 200.000 cellules environ, cultivées sur lamelles.

Les cellules témoins, non infectées, observées au contraste de phase, après fixation à l'alcool-acétique présentent une chromatine nucléaire granuleuse, répartie de façon homogène.

L'observation des cellules infectées a permis de mettre en évidence des modifications morphologiques (travail en collaboration avec PRUNIERAS et SOHIER, 1961-48) pouvant se ramener à 3 phases successives.

Première phase : formation du réseau centronucléaire.

Lorsque les premières lésions sont décelables, on remarque, par observation au contraste de phase de cellules fixées ou de cellules colorées à l'hématéine-éosine ou par l'érythrosine-bleu de toluidine, l'apparition de petits grains isolés éosinophiles de 2 à 3 μ de diamètre. Ces grains sont au nombre de 4 à 10 et toujours à distance des nucléoles. Il arrive que ces grains s'agglomèrent par 6 ou 8 ou qu'ils soient de très petits anneaux éosinophiles de 1 μ de diamètre. Ces grains sont souvent séparés du matériel nucléaire par une zone claire chromophobe.

Puis apparaissent des grains primaires de 1 à 2 μ , soit isolés, soit réunis en chapelet, soit attachés à un filament plus ou moins tortueux.

Ensuite, on voit se former des anneaux éosinophiles atteignant 4 à 5 μ de diamètre, circulaires ou ovalaires. Au centre de certains anneaux on reconnaît un petit cercle concentrique, l'ensemble donnant l'aspect d'un disque.

Les anneaux sont souvent entourés de petits grains très fins basophiles disposés en cercle.

Les anneaux et les disques entourés de grains basophiles très fins sont situés au sein d'un vaste réseau basophile qui s'étend à toute la masse nucléaire en respectant les nucléoles. Ils sont séparés de la membrane nucléaire par un espace clair de 2 à 3 μ .

Cette phase correspond à ce qu'on peut appeler la « période éosinophile ».

Deuxième phase : formation de la masse centrale.

On assiste à la densification et à la rétraction du réseau baso-

phile constitué à la fin de la première phase, en une masse centrale typique.

La basophilie augmente considérablement tandis que l'espace entre le réseau et la membrane nucléaire s'élargit et se compare.

Les nucléoles peu modifiés se retrouvent dans cet espace qui tend à prendre l'aspect de « pétales ». Cet aspect est dû aux festons que forme la membrane nucléaire.

Dans quelques cas, le réseau qui se constitue après l'apparition d'inclusions éosinophiles primaires n'a pas lieu. Il se forme alors de vastes espaces vacuolaires et la masse centrale typique n'est pas formée.

Il arrive que la masse centrale constituée normalement reste attachée à la membrane nucléaire par un pédicule et que les « pétales » entre la masse centrale et la membrane nucléaire soient granuleux.

On remarque ainsi que les espaces entre la masse centrale et la membrane nucléaire appelés « pétales » ou encore « matrice » par certains auteurs, sont tantôt optiquement clairs, tantôt granuleux et optiquement sombres. Cette différence se retrouve au niveau des cristaux qui s'y forment. Cette phase correspond à la « période basophile ».

Troisième phase : formation des cristaux.

Dans les espaces (« pétales » ou « matrice ») séparant la masse centrale de la membrane nucléaire, on voit apparaître des formations allongées ayant l'allure de cristaux. Ils peuvent être longs et effilés, ou bien gros, courts, de section carrée et d'arête très nette.

Les cristaux clairs se rencontrent généralement dans les espaces clairs, les cristaux sombres dans les espaces sombres et dans quelques cas nous avons observé des cristaux présentant une partie centrale sombre et des extrémités claires. Il semble que les cristaux sombres soient constitués de cristaux clairs enrobés de matériel basophile FEULGEN positif.

Enfin, nous avons pu trouver dans des cas très rares des cristaux très fins, longs et clairs, intracytoplasmiques, au sein d'une zone granuleuse juxtanucléaire, alors que le noyau ne présentait pas de lésion cytologique décelable.

Les cellules infectées par l'adénovirus type 4 peuvent présenter des cristaux d'allure différente de celle décrite pour le type 5. Ils sont généralement courts et de section polyédrique disposés à la périphérie du noyau et nombreux. Avec une coloration au GIEMSA, ils sont incolores par opposition aux cristaux petits, nombreux et hypercolorés que l'on peut rencontrer dans la masse centrale. Ces derniers cristaux sont beaucoup mieux visibles après coloration par le FEULGEN car ils sont positifs.

Il ressort de nos études (sur cellules T1 ou sur cellules amniotiques) que la lésion essentielle est la masse centrale intranucléaire. Lorsque cette masse centrale se constitue on assiste

à un remaniement du noyau tout entier : les nucléoles sont percés de trous, la membrane nucléaire se festonne. Des modifications d'ordre physique se traduisent par le phénomène de cristallisation.

Au niveau du cytoplasme, on remarque que les mitochondries sont courtes, gonflées et rassemblées aux deux pôles du noyau.

Cette masse centrale peut prendre des aspects très variés. C'est ainsi qu'au cours d'une étude sur cellules T1 ou cellules HeLa infectées par les 17 prototypes d'adénovirus, nous avons décrit 4 aspects différents (en collaboration avec SOHIER et PRUNIERAS, 1960 - 314) :

— *premier aspect* dans lequel la masse centrale tend à se fragmenter en boules serrées les unes contre les autres. Cet aspect se rencontre spécialement avec les types 1 et 2 ;

— *deuxième aspect* où la masse centrale s'entoure de « pétales » dus aux festons de la membrane nucléaire. La chromatine se dispose en grains de chapelet le long de la membrane nucléaire. Cet aspect est fréquent dans les types 3, 4, 5 et 6. Le type 5 présente dans les pétales les formations cristallines que nous venons de décrire ;

— *troisième aspect* dans lequel la masse centrale reste reliée à la membrane nucléaire par des brides. Il n'y a pas de margination de la chromatine. Cet aspect est fréquent avec les types 11, 14 et 17 et un peu moins net avec les types 12, 13, 15 et 16 ;

— *quatrième aspect* correspondant à la lésion commune à tous les types. La masse centrale est hypercolorée et entourée d'une zone claire, elle-même limitée par la membrane nucléaire contre laquelle se trouve un fin liseré chromatinien. Les nucléoles persistants sont repoussés à la périphérie. Ce type de lésion a été particulièrement décrit au cours d'une étude sur les altérations cellulaires provoquées par l'adénovirus type 7a avec PRUNIERAS (1957 - 275 ; 1958 - 276).

b) Lésions morphologiques non spécifiques :

A côté des lésions spécifiques que nous venons de décrire et qui se caractérisent finalement par l'existence, après 40 heures d'évolution, d'une masse centrale intranucléaire néoformée, il existe un grand nombre d'altérations cellulaires ne présentant pas cette caractéristique et qui pourtant surviennent uniquement lorsque les cellules sont en contact avec la suspension virale.

Une classification rigoureuse de ces aspects variés de la souffrance cellulaire de caractère non spécifique nous a paru impossible sans dénaturer par la schématisation la nature des faits. Le problème se pose de la manière suivante que nous illustrons par l'exemple ci-après :

— Soit 2 populations cellulaires A et B de 100.000 éléments environ placées dans les mêmes conditions d'expérimentation.

— La population A est infectée par la suspension d'adénovirus type 5 (lot 5-126) soit 10 à 100 DICT50. La dégénérescence cellulaire a lieu en 48 à 60 heures.

— La population B est infectée par la même suspension d'adénovirus type 5 (lot 5-126) à raison de 100 à 1.000 DICT50, c'est-à-dire 10 fois plus de virus. La dégénérescence des cellules est observée en 16 à 24 heures.

Les altérations de la population cellulaire A sont en grande majorité caractéristiques au bout de 48 heures environ au faible grossissement. L'examen des noyaux au fort grossissement confirme ces aspects.

Dans le cas de la population cellulaire B, la dose de virus étant très supérieure, l'effet de la destruction est beaucoup plus rapide.

Si l'on examine au faible grossissement la population A à 48 heures et la population B à 20 heures par exemple, les altérations globales paraissent identiques.

Si l'on observe au fort grossissement les noyaux de la population B, comme on a fait pour la population A, on s'aperçoit que les altérations globales estimées au faible grossissement ne correspondent pas à la présence de masses centrales spécifiques à l'intérieur des noyaux. On est donc amené à dire que la population A a subi une dégénérescence spécifique et que la population B a subi une dégénérescence non spécifique. Le problème qui se pose alors est d'essayer de définir le mode de dégénérescence non spécifique en cause.

Dans l'exemple que nous venons de citer, la forte concentration en virus, la précocité de la destruction cellulaire sont des caractères qui rappellent les agressions déjà connues en expérimentation microbiologique et déjà classées sous la rubrique générale d'effet « toxique ».

Cependant les dégénérescences non spécifiques ne sont pas obligatoirement en relation avec un effet « toxique » de ce genre. Si en effet au lieu d'utiliser des quantités de virus très importantes on fait l'opération inverse et qu'on infecte la population B avec 1,6 DICT50 d'adénovirus type 1, on s'aperçoit que les cellules de la population B ne montrent aucune différence avec celle de la population A, à 7 jours au moins. Si on poursuit l'expérience au-delà de 7 jours, une altération de la couche cellulaire se produit. Cette altération est visible au faible grossissement, caractéristique au fort grossissement et une dégénérescence spécifique a lieu. Or, nous savons que des cellules en survie dans un milieu privé de sérum (à cause des anticorps) ne se maintiennent pas dans un état « normal » beaucoup plus de 7 jours. Il se trouve alors que, lorsque la population B présente des altérations caractéristiques, les témoins présentent aussi des altérations qui ne sont pas dues au virus. Ceci laisse supposer que la dégénérescence de la population B n'est pas due seulement au virus. Il est possible d'envisager la combinaison d'un « effet viral » et d'un trouble métabolique.

Dans ces conditions, on est obligé d'étudier les altérations cytologiques dans un délai intermédiaire entre la période « toxique » précoce et la période tardive métabolique.

Si l'on cherche à établir la correspondance entre la multiplication virale et les lésions cytologiques, on est obligé de considérer qu'à côté des effets cytologiques spécifiques définis plus

haut, existe une faible proportion variable d'éléments cellulaires qui présenteront des altérations non spécifiques ayant une origine « toxique » ou métabolique.

Cette notion nous paraît particulièrement importante :

— d'abord parce qu'elle montre l'importance capitale de l'estimation quantitative de la multiplication virale ;

— ensuite parce qu'elle fait apparaître l'hétérogénéité de la population cellulaire considérée.

Une telle hétérogénéité est concevable si l'on considère que les cellules en culture ne peuvent pas se trouver toutes en même temps au même stade évolutif de leur cycle physiologique.

Après avoir tenté de définir comment se pose le problème des dégénérescences non spécifiques, il semble que nos observations puissent se diviser en deux groupes.

α — Aspects de type toxique.

Au *faible grossissement*, en reprenant le premier exemple des doses massives de virus, l'examen montre qu'au bout de 16 à 24 heures, toutes les cellules se sont arrondies, contractées, mises en boule. Elles sont fortement réfringentes et d'une couleur blanc brillant. Elles ressemblent à de petites sphères, dont la surface serait irrégulière. Ces cellules ne tiennent plus au verre et se détachent très facilement. De plus, toutes les cellules sont séparées les unes des autres et tapissent régulièrement la surface du tube.

Au *fort grossissement*, les cellules très arrondies permettent très difficilement l'examen du noyau. Toutefois, on ne voit pas de masse centronucléaire. Les altérations majeures paraissent d'ordre cytoplasmique. Il nous est apparu que l'examen statique était impropre dans ce cas particulier et nous avons utilisé la méthode des enregistrements micro-cinématographiques.

β — Aspects de type sénescence.

Au *faible grossissement*, les cellules s'altèrent très progressivement, non pas par un arrondissement brutal et détachement rapide, mais par une transformation lente et insensible. On reconnaît les cellules altérées à leur teinte grise, à l'accumulation de petits grains noirs dans le cytoplasme, à l'apparition de nombreux débris noirâtres de taille variable qui se maintiennent soit en suspension dans le milieu, soit temporairement attachés au verre. Le noyau devient visible à cause d'une modification de son indice de réfraction. L'adhérence au verre diminue et les cellules sont emportées par le courant liquide à la moindre agitation.

Au *fort grossissement*, tous les types de mort cellulaire classique peuvent se rencontrer, depuis les aspects de potocytose jusqu'à ceux de caryolyse.

Correspondant à l'observation au faible grossissement, deux altérations sont particulièrement significatives : d'une part l'accumulation d'enclaves éosinophiles intra-cytoplasmiques et d'autre part la pycnose nucléaire.

La connaissance des anomalies cellulaires, en relation avec les

conditions de culture, a attiré notre attention spécialement sous l'angle dynamique.

B. — ETUDES CYTOCHIMIQUES

Après avoir établi les modifications morphologiques des cellules dues aux adénovirus, nous avons tenté d'approfondir quelque peu ces notions purement descriptives. En employant quelques techniques cytochimiques, nous avons essayé de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre la multiplication virale et les aspects morphologiques spécifiques rencontrés.

1) Etudes des acides nucléiques.

Nos premières recherches sur les cellules T1 ou HeLa infectées par l'adénovirus type 7a (en collaboration avec PRUNIERAS et SOHIER, 1957 - 275, et avec PRUNIERAS, 1958 - 276) nous ont permis de mettre en évidence des remaniements des acides nucléiques de la cellule.

Au cours de notre étude des 17 types d'adénovirus, nous avons cherché si la répartition qualitative des acides nucléiques du noyau infecté varie selon les types. Il a été possible de mettre en évidence un processus commun des modifications cytochimiques au cours du développement du virus dans la cellule, quels que soient les aspects morphologiques observés.

Après coloration par le vert-de-méthyle-pyronine, on observe au fort grossissement, au début de l'infection, une augmentation de la pyroninophilie cytoplasmique et nucléaire. Au stade suivant, la pyroninophilie nucléaire se localise au niveau d'un réseau rouge tendant à réunir les nucléoles entre eux en les respectant. Autour de ce réseau rouge, il se constitue une zone claire entourée par une bande verte elle-même séparée du cytoplasme par une zone chromophobe. Le noyau a perdu son réseau chromatinién.

Cette augmentation de teinte rouge suggère un accroissement de matériel acide, acides nucléiques ou protéines. Puis la bande verte tend à se vacuoliser dans le cas des types 3, 4 et 5, tandis que le centre du réseau prend une teinte verte qui va en s'accroissant. La masse centrale ainsi constituée devient violacée par combinaison du vert et du rouge. Dans le cas des types 11, 14 et 15, la masse centrale est violacée et les « spicules » restent verts. L'augmentation de la teinte verte traduit l'augmentation de matériel acide, acides nucléiques ou protéines. L'apparition de la teinte violette suggère la combinaison des deux éléments. La masse centrale qui se constitue dans le noyau s'organise à l'endroit exact où existe le réseau rouge. Les nucléoles sont respectés. Parfois ils sont désintégrés et sont repoussés à la périphérie de la masse centrale.

En contrôlant la coloration au vert-de-méthyle-pyronine par la ribonucléase, dans les conditions définies par BRACHET (test de BRACHET) on s'aperçoit que toute pyroninophilie disparaît pour des concentrations d'enzyme aussi basses que 0,05 g p. 1.000 et un temps de contact de 30 minutes à 37°C. La coloration de FEULGEN réalisée sur des préparations semblables, a permis d'apporter confirmation de la modification de la répartition des

acides désoxyribonucléiques au cours du développement du virus dans la cellule.

Les remaniements des acides nucléiques cellulaires sont particulièrement spectaculaires sur les cellules T1 infectées par l'adénovirus type 5 (lot 5-912).

Avec la coloration de FEULGEN, les meilleurs résultats ont été obtenus par fixation à l'acide osmique.

Dans les cellules non infectées, le noyau présente une coloration homogène et pas de réaction positive au niveau des nucléoles.

Les cellules infectées présentent une réaction intense au niveau de la masse centrale et peu de réaction au niveau des « pétales ». Les cristaux sont généralement négatifs. Certains cristaux situés en dehors de la masse centrale peuvent présenter une réaction faible. Lorsqu'ils sont inclus dans la masse centrale, ils sont FEULGEN négatifs.

Dans le cas de l'adénovirus type 4, les cristaux sont inclus dans la masse centrale et sont FEULGEN positifs.

Pendant la période primaire, les inclusions éosinophiles sont FEULGEN négatives. Le test de BRACHET a donné de bons résultats sur des préparations séchées à l'air. L'examen des préparations colorées par le vert-de-méthyle-pyronine, en combinant la coloration et le contraste de phase, nous a fourni quelques indications sur le comportement du nucléole.

Au début de l'infection, on assiste à une augmentation du nombre des nucléoles vacuolisés. Les nucléoles sont bleu-noirs au lieu d'être rouges. Lorsque la masse centrale se constitue, les nucléoles se densifient et sont repoussés à la périphérie. Ils sont bleu-noirs. Ils peuvent s'entourer d'une zone vert clair, elle-même délimitée par une zone granuleuse pyroninophile. Lorsque la masse centrale est formée, les nucléoles peuvent soit persister sous forme de masses et rester en relation avec la membrane nucléaire par un pédicule, soit disparaître complètement.

On assiste non seulement à ces modifications nucléolaires, mais aussi à des variations de la pyroninophilie extranucléolaire. Les grains pyroninophiles s'organisent en un réseau rouge correspondant à celui décrit précédemment. C'est à ce niveau que va se constituer la masse centrale avec apparition d'une teinte verte. vert-de-méthylphilie pouvant correspondre à l'augmentation d'acides désoxyribonucléiques. La masse centrale devient très colorée, souvent violette par combinaison des deux teintes. Un traitement des préparations par la ribonucléase supprime toute pyroninophilie et la masse centrale apparaît verte.

En suivant l'évolution de la coloration au vert de méthyle-pyronine en fonction des stades morphologiques, les formations éosinophiles se rencontrent d'abord comme une zone chromophobe de 1 à 2 μ au centre de laquelle se trouve parfois un grain pyroninophile. Puis autour de la zone chromophobe, il apparaît un liséré pyroninophile granulaire. Les images en disques correspondent à un anneau granulaire de ce type entourant un grain pyroninophile central. Au stade plus avancé, la pyroninophilie tend à disparaître au niveau des disques et des anneaux tandis

qu'apparaît ou que s'accroît la vert-de-méthylphilie. Parfois même, un disque « vert-de-méthylphile » semble s'être substitué à un anneau ou à un disque auparavant pyroninophile. Les formations cristallines et les « pétales » ne sont pas colorés. Certains cristaux peuvent présenter un fin liséré vert.

2) Etude des protéines.

Nous avons tenté de mettre en évidence les remaniements des protéines au cours de notre étude de l'adénovirus type 5 sur cellules T1 (en collaboration avec PRUNIERAS et SOHIER, 1962 - 278).

Il ressort que les réactions au DMAB nitrite, d'ADAMS, pour le tryptophane sont négatives. Les réactions pour les protéines contenant la tyrosine sont faiblement positives au niveau des masses centrales, des cristaux.

Les réactions pour les groupements NH_2 liés aux protéines sont fortement positives au niveau de la masse centrale et faiblement positives au niveau des « pétales » et des cristaux. Une étude des cellules normales montre qu'on obtient une réaction positive au cours de la mitose, au niveau du fuseau, là où il existe une pyroninophilie non résistante à la ribonucléase.

3) Etude des sucres.

Nous avons essayé de voir les modifications des sucres (hexoses ou pentoses) au cours de la multiplication de l'adénovirus type 5 sur cellules T1.

Les réactions à l' α -naphтол, à l'orcinol et à la bromoaniline ont donné des résultats comparables. Les cellules normales présentent une réaction négative dans le cytoplasme et positive dans le noyau sous forme de grains rouges. Les nucléoles, lorsqu'ils sont vésiculeux, donnent parfois une forte réaction rouge, au niveau de la ou des vésicules (ou vacuoles).

Chez les cellules normales on observe des variations de coloration selon les phases de la mitose. La réaction est plus intense à la prophase et à la télophase.

Lorsque les cellules sont infectées depuis peu de temps, on observe une coloration rouge comme dans les cellules en prophase. Les nucléoles présentent une coloration intense au niveau des vacuoles.

La masse centrale présente une réaction granulaire rouge. De petites vacuoles colorées peuvent apparaître dans cette masse centrale.

4) Etude enzymatique.

Nous avons essayé de mettre en évidence des modifications de l'activité phosphatase acide au cours de l'infection des cellules T1 par l'adénovirus type 5 (en collaboration avec PRUNIERAS et SOHIER, 1962 - 50).

Les meilleurs résultats ont été obtenus après dessiccation à $+ 4^\circ\text{C}$ ou par fixation au formol à 10 p. 100 à $\text{pH} = 5,1$ pour la

méthode aux sels de diazonium (GREEN et VERNEY, 1956 - 152) et par fixation au formol à 10 p. 100 pour la méthode de GOMORI (1941 - 146).

Les cellules non infectées présentent un nombre variable de grains, noirs pour la méthode au plomb, rouges violets pour la méthode aux azoïques, répartis dans le cytoplasme. Pour la méthode aux azoïques, une diffusion se traduit par l'apparition de couleur rouge brique autour du noyau. Pas d'effet de diffusion par la méthode de GOMORI. Il arrive qu'il y ait dans une zone juxtanucléaire des grains de grosse taille (2 à 3 μ).

Au cours de la mitose, on remarque des variations dans la répartition des grains. La réaction est presque nulle au cours de la métaphase et réapparaît après la télophase.

Les deux méthodes employées simultanément ont donné des résultats comparables.

L'activité phosphatasique acide varie selon les conditions de culture. C'est ainsi que dans un milieu à 5 p. 100 de sérum de veau, les cellules ne présentent pas d'activité phosphatasique acide jusqu'à 48 heures d'incubation dans ce milieu. Si à 48 heures, le milieu est remplacé par un milieu sans sérum, on note une activité phosphatasique acide dès 9 heures après le changement, elle est maximum 48 heures après.

L'activité enzymatique globale d'une population de cellules infectées est très comparable à celle des cellules non infectées jusqu'à 48 heures après l'infection. Cette activité tend vers zéro de 48 à 56 heures pour reprendre entre 56 et 72 heures.

La méthode au plomb a permis une observation détaillée des cellules, par combinaison de la coloration et l'examen en contraste de phase. On retrouve ainsi les phases de la formation de la masse centrale : inclusions primaires, grains, anneaux ou disques, masses centrales ou cristaux. Il n'a pas été possible de systématiser les rapports entre l'intensité de l'activité phosphatasique et les lésions observées. Au cours de la phase éosinophile primaire, on trouve soit une activité normale, soit une diminution de l'activité enzymatique pouvant aller jusqu'au blocage complet. Rappelons qu'un tel blocage peut se rencontrer dans les cellules normales au cours de la mitose. Si l'intensité de la réaction au plomb varie sans rapport systématique apparent avec la formation des inclusions spécifiques, il y a lieu de noter cependant que cette réaction devient fréquemment positive et même fortement positive dans une zone juxtanucléaire. Cette zone correspond morphologiquement à la zone golgienne.

Ce remaniement des lieux d'activité enzymatique se traduit par une diminution du nombre de grains répartis dans le cytoplasme et leur accumulation dans la zone golgienne.

Dans la seconde période basophile, la réaction est à son minimum, le nombre de grains diminue encore.

Enfin dans la période tertiaire, on note quelques rares grains de grosse taille, parfois situés au contact de la membrane nucléaire plus ou moins déformée.

C. — RESUME

Les méthodes statiques nous permettent de dégager les faits suivants :

Quarante-huit heures après adjonction du virus au milieu, les cellules présentent une volumineuse inclusion intranucléaire, FEULGEN positive, entourée d'un matériel acidophile donnant une réaction positive pour les groupements NH_2 et la tyrosine et négative pour le tryptophane. Au sein de ce matériel, il existe parfois des structures d'allure cristalline. Le caractère FEULGEN positif de l'inclusion nucléaire apparaît comme le stade terminal d'une évolution en trois phases subies par le noyau :

— *Première phase* : apparition d'inclusions acidophiles, FEULGEN négatives.

— *Deuxième phase* : augmentation de la teneur du noyau en matériel basophile, FEULGEN négatif, et non résistant à la ribonucléase.

— *Troisième phase* : apparition d'une nouvelle basophilie, FEULGEN positive, et résistante à la ribonucléase.

Ces modifications nucléaires sont en relation avec la multiplication virale.

Dans le cytoplasme, les activités phosphatasiques acides varient pendant la phase acidophile. Elles ont tendance à se regrouper dans la zone golgienne.

II. — DISCUSSION.

Nous discuterons successivement les aspects morphologiques et cytochimiques.

A. — ETUDES MORPHOLOGIQUES

Il nous est apparu important de rapporter les constatations des auteurs sur l'appréciation des altérations cellulaires qui sont l'indice des lésions biochimiques créées par les adénovirus dans les cellules. Le premier moyen dont nous disposons, c'est l'observation au microscope à faible grossissement puis à des grossissements plus importants, en procédant à des colorations qui nous ont permis de mettre en évidence certains types de lésions spécifiques du groupe adénovirus.

1) Examen « in vivo » à un faible grossissement.

Il est possible de suivre l'apparition et l'évolution des modifications cellulaires à un faible grossissement (20 environ) en observant les cultures tous les jours pendant une période variable selon les cellules employées et pouvant aller jusqu'à 6 semaines.

Nous pensons qu'il est utile de rapporter les diverses lésions observées sur les différentes cultures, que ce soit des cultures de cellules isolées qui se développent en nappe ayant une origine humaine néoplasique ou normale, ou bien une origine animale, ou encore que ce soit des explants de tissus mis en culture qui

produisent une lame cellulaire attaquée par le virus. Ces différences nous permettent de prévoir que la multiplication du virus dans la cellule-hôte varie.

a) *Cellules HeLa :*

ROWE et coll. (1953-293), HILLEMANN et coll. (1954-166), KJELLEN (1955-191) observent que les adénovirus provoquent des lésions cellulaires différentes de celles des autres virus tels que celui de la poliomyélite, l'herpès, la vaccine. Les délais d'apparition de ces altérations sont plus longs, 3 semaines dans certains cas au lieu de 2 semaines pour la poliomyélite.

L'allure générale d'une culture infectée est la suivante : les cellules deviennent rondes, elles ont tendance à former des agglomérats. Dans ces agglomérats, les cellules sont mal délimitées, granuleuses et donnent l'impression d'être fusionnées toutes ensemble. Les premières modifications apparaissent 24 à 48 heures après l'introduction du virus. Les nappes cellulaires sont complètement détruites entre 48 et 72 heures. A ce moment les cellules se détachent de la paroi du tube.

Des granulations denses se voient particulièrement dans la période d'incubation quand celle-ci se prolonge et que les altérations cellulaires se développent lentement (ROWE et coll., 1953-293 ; HUEBNER et coll., 1954-175 ; ROWE et coll., 1955-294 ; HILLEMANN et coll., 1954-166 ; KJELLEN, 1955-191 ; BARSKI, 1956-17 ; BARSKI et coll., 1958-22 ; LÉPINE et coll., 1956-209 ; 1957-211 ; FUKUMI et coll., 1957-127 ; BEALE et coll., 1957-23 ; NASZ et coll., 1958-242 ; JAWETZ et coll., 1955-176 ; 1955-177 ; ENJALBERT et coll., 1960-95).

Il a été possible de faire quelques distinctions de groupe entre les types d'adénovirus. C'est ainsi que BARSKI (1956-17), BARSKI et coll. (1958-22) ont pu individualiser deux aspects d'altérations cellulaires :

— *Aspect 1* : il est commun aux types 1, 2 et 5. D'abord une rétraction de l'ensemble de la nappe cellulaire en mailles. Les noyaux apparaissent gonflés.

— *Aspect 2* : il est commun aux types 3, 4 et 7. Tendance peu prononcée à la rétraction avec formation d'agglomérats cellulaires denses et irréguliers et désagrégation de la culture par effritement.

LÉPINE et coll. (1957-211) décrivent un troisième aspect où la rétraction apparaît encore moindre.

Au début, il y a peu de cellules atteintes. L'extension se fait par cytophagie : les cellules, malades le plus souvent, se trouvent englobées dans le cytoplasme d'autres cellules, dont le noyau apparaît déformé en croissant et refoulé à la périphérie.

JAWETZ et coll. (1955-176 ; 1955-177) soulignent la lenteur d'apparition des altérations cellulaires avec le type 8.

b) *Cellules amniotiques humaines :*

WEINSTEIN et coll. (1956-334), BEALE et coll. (1957-23), NASZ et coll. (1958-242) ont montré que les premières modifica-

lions apparaissent plus tardivement sur cellules amniotiques que sur les cellules HeLa et elles ne sont jamais totales. Les cellules ont tendance à s'arrondir, deviennent hyalines. Peu d'entre elles se détachent du verre.

NASZ et coll. (1958 - 242 ; 1960 - 244) retiennent deux modes de dégénérescence, voisins de ceux décrits par BARSKI (1956 - 17), BARSKI et coll. (1958 - 22).

c) *Cellules de rein humain* (cellules T1) :

ORFILA (1958 - 251) rapporte ses observations sur la croissance du virus type 7 sur cellules de rein humain en culture continue. Peu de différences sur les cellules HeLa.

d) *Cellules de reins de singe* :

BARSKI (1956 - 17) constate que la destruction des cellules de reins de singe est moins uniforme que dans les cellules HeLa. LÉPINE et coll. (1957 - 211) montrent que les adénovirus atteignent d'abord les cellules épithéliales à la périphérie des cultures. Ils ont une certaine prédilection pour les cellules jeunes, surtout après la mitose. Les cellules sont également atteintes avant, pendant ou après la mitose.

D'une façon générale, les cultures présentent des cellules arrondies 2 à 3 jours après l'infection. Elles sont rondes, granuleuses, souvent vacuolisées, éparses dans la nappe, les membranes ne sont plus visibles. Les effets cytopathogènes augmentent progressivement, surtout lorsque la période d'incubation est longue. Ce sont les travaux de ROWE et coll. (1955 - 294), BARSKI (1956 - 17), LÉPINE et coll. (1957 - 211), DROUHET (1957 - 75).

e) *Cellules de lapin* :

BARSKI et coll. (1958 - 22) étudient les modifications subies par des cellules de lapin (reins, rate, testicules ou trachée) quand on introduit des adénovirus. On observe des altérations cellulaires plus ou moins intenses et spécifiques dans les cultures de trachée ou de reins de lapin comportant des éléments épithéliaux et aussi dans les cultures de rate et de testicules de lapin présentant des cellules mésenchymateuses.

f) *Modifications cellulaires obtenues sur des cultures d'explants* :

ROWE et coll. (1953 - 293), HUEBNER et coll. (1954 - 175) mettent en culture des végétations adénoïdes avec du plasma de poulet et observent des modifications d'abord à la périphérie de la nappe cellulaire 8 à 28 jours après la mise en culture. Les lésions progressent de la périphérie vers le centre de la nappe et les cellules se détachent en 7 à 14 jours. Peu de modifications des fibroblastes tant que les cellules épithéliales ne sont pas complètement détruites. Les liquides de cultures adénoïdiennes passés sur d'autres cultures : tissus adénoïdiens, tissus embryonnaires humains ou cellules HeLa, donnent des modifications caractéristiques. Les travaux de BALDUCCI et coll. (1956 - 12) ont confirmé ces résultats.

Des fragments de tissus embryonnaires humains (nez, pharynx, palais, langue, trachée, peau, muscles, pancréas), des fragments

de poumons humains ou de bronches et de trachées ont été mis en culture. Les modifications des cellules épithéliales apparaissent plus tôt que celles des fibroblastes. Ce sont les travaux de ROWE et coll. (1955 - 294), NEVA et coll. (1954 - 246), KJELLEN (1955 - 191) et BARSKI et coll. (1957 - 21).

Des différences dans les modifications cellulaires sont observées selon les cultures d'organes d'animaux.

ROWE et coll. (1955 - 294), BARSKI et coll. (1958 - 22) mettent en culture des fragments de trachée de jeune lapin ou d'adulte. Trois à 6 jours après l'inoculation, apparition de cellules rondes, réfringentes, à la périphérie de la nappe épithéliale. Puis la plupart des cultures ne montrent plus de cellules rondes, la nappe cellulaire a tendance à diminuer son épaisseur.

Avec les cultures de reins de lapin, BARSKI et coll. (1958 - 22) obtiennent des lésions analogues à celles décrites avec les cultures continues de cellules de testicules ou de rate de lapin. Avec les cultures de fragments de testicules de singe, ROWE et coll. (1953 - 293) n'obtiennent pas toujours des altérations cellulaires.

BARSKI et coll. (1957 - 21) constatent avec les cultures de trachée de singe, l'apparition de cellules rondes à la périphérie de la nappe épithéliale, après 2 ou 3 jours d'incubation. 9 jours après, il reste encore des cellules normales. En pratiquant des sections sur ces fragments de trachées après 26 jours de culture, soit 16 jours d'infection virale, on remarque des cellules épithéliales ciliées normalement avec des cellules typiques sur le front de pousse.

Des cultures de muscles ou de trachées de rat permettent l'apparition d'altérations cellulaires typiques au niveau des fibroblastes avec les types 1 et 2. Pas de lésions avec les types 3 et 4. Ce sont les travaux de ROWE et coll. (1955 - 294).

2) Examen au fort grossissement après coloration.

Les méthodes de fixation des cultures cellulaires ou des explants sont nombreuses, elles varient selon la coloration utilisée. Les colorations à l'hématoxyline, hémateïne-éosine, GIEMSA, phloxine-tartrazine, ont seulement une valeur pour l'étude morphologique des lésions observées. D'autres colorations histochimiques ont été vues au cours de notre étude sur la multiplication virale et ne seront pas reprises ici.

a) *Lésions morphologiques spécifiques :*

Tous les auteurs ont fixé et coloré des cellules non infectées, à titre de contrôle, pour éliminer les causes d'erreurs. La morphologie des lésions a été étudiée sur cellule HeLa, cellules de rein humain (souche T1) en culture continue, cellules de reins de singe et des explants.

α — Cellules HeLa.

Les lésions observées sont surtout nucléaires.

Nous retenons la classification de BOYER et coll. (1957 - 37) qui ont étudié les types 1 à 4 en effectuant des prélèvements de

6 heures à 7 jours. Ils remarquent que les lésions nucléaires sont peu nombreuses au début et semblent maxima quand la multiplication virale est maximum. Ils observent une diminution de l'activité mitotique. Deux aspects ont été individualisés selon les types :

— *Premier aspect correspondant aux types 1 et 2* : les noyaux présentent des granules éosinophiles entourés par une zone claire et des corps ronds ou ovoïdes éosinophiles soulignés d'une ligne basophile. Puis, dans les lésions plus avancées, formation d'une masse basophile entourée d'une zone claire ; les granules éosinophiles prenant une structure en nids d'abeille, le noyau augmentant de taille considérablement. Enfin, il se forme une masse centrale, le cytoplasme diminue de taille et les cellules se détachent.

— *Deuxième aspect correspondant aux types 3 et 4* : certains noyaux sont constitués par une ou plusieurs masses éosinophiles ; d'autres contiennent une masse centrale granuleuse séparée de la membrane par une zone claire. Le noyau augmente de taille, les nucléoles ne sont plus visibles, la zone périnucléaire s'élargit puis présente des vacuoles à contours anguleux avec des inclusions ressemblant à des cristaux. Ces cristaux sont parfois entourés d'une matière basophile. Dans le stade des lésions très avancées, la masse centrale est très foncée et la membrane nucléaire ne se voit plus.

BARSKI et coll. (1958 - 22) reprennent la même classification et ajoutent le type 5 au groupe 1 et 2 et le type 7 au groupe 3 et 4. Le groupe 1, 2 et 5 est dit à lésions de type vacuolaire et le groupe 3, 4 et 7 est dit à lésions de type compact.

LÉPINE et coll. (1957 - 211) ajoutent un troisième aspect dans lequel on reconnaît une vacuolisation nucléaire mais le noyau est moins gonflé qu'avec les autres types.

Les autres auteurs, HILLEMANN et coll. (1954 - 166), FUKUMI et coll. (1957 - 127), BEALE et coll. (1957 - 23), LÉPINE et coll. (1956 - 209), DROUHET (1957 - 75) décrivent pour les types étudiés des lésions analogues à celles précédemment données.

KJELLEN (1955 - 191) a décrit dans quelques cellules une margination de la chromatine et un corps acidophile entouré d'un halo clair que d'autres n'ont pas retrouvé.

Si les lésions produites par les adénovirus sur les cellules HeLa sont essentiellement nucléaires, il existe quelques modifications cytoplasmiques notées par HILLEMANN et coll. (1954 - 166) avec le type 4, BARSKI (1956 - 17), LÉPINE et coll. (1956 - 209, 1957 - 211) et BOYER et coll. (1957 - 37).

BOYER et coll. (1957 - 37) notent pour les types 1 et 4 dans les lésions précoces une tendance à l'hétérogénéité du cytoplasme, une vacuolisation marquée et protrusion. Dans les lésions tardives, on observe des zones granuleuses, denses, éosinophiles. En même temps que le noyau augmente de volume, celui du cytoplasme diminue et dans les stades terminaux il se désintègre.

Il faut remarquer que dans quelques cas, les cellules HeLa non infectées ont un cytoplasme sombre présentant quelquefois des inclusions.

β — Cellules amniotiques humaines.

Poursuivant leurs études sur la réponse des cellules amniotiques humaines aux adénovirus types 3 et 5, NASZ et coll. (1960 - 244), rapportent les observations suivantes :

Dans la *dégénérescence de type 3*, on assiste à un arrondissement et à une rétraction des cellules en 24 à 48 heures de la périphérie vers le centre de la nappe cellulaire. Le cytoplasme apparaît comme un halo clair autour du noyau. Les cellules restent reliées entre elles par de longs prolongements cytoplasmiques résultant de la formation d'un réseau à partir de la nappe cellulaire. Des granulations apparaissent dans le noyau et les cellules dégénérées forment de petits paquets.

Dans la *dégénérescence de type 5*, les cellules de bordure deviennent granuleuses puis disparaissent. Les petits granules prennent différentes formes, telles que des croissants, des anneaux ou des masses centrales à l'intérieur de la membrane nucléaire. En même temps qu'apparaissent les lésions nucléaires, le cytoplasme peut présenter des aspects dégénératifs, vacuolaires.

Les auteurs remarquent souvent la présence de formations cristallines, d'origine indéterminée, dans le noyau ou le cytoplasme de cellules dégénérées.

Avec l'adénovirus type 5, BETZ et coll. (1961 - 30) observent des modifications cellulaires très voisines.

γ — Cellules de rein humain.

ORFILA (1958 - 251) utilise le type 7 et décrit les premières lésions comme étant exclusivement nucléaires et peu nombreuses. Le noyau apparaît clair. Les nucléoles sont intacts dans les noyaux clairs et se différencient des zones denses homogènes basophiles. Ils sont toujours intensément colorés, ils sont séparés des zones denses basophiles par de petites zones claires. Par la suite le noyau est occupé par la masse centrale basophile au sein de laquelle les nucléoles sont toujours visibles. Autour de la masse centrale, une zone périphérique claire est traversée par des ponts. A ce moment les nucléoles ne sont plus visibles.

Le cytoplasme ne présente pas de vacuoles et pas d'inclusion sur le pourtour des cellules altérées ; apparition de cellules multinucléées (5 noyaux en moyenne) : cette lésion semble spécifique du type 7.

BETZ et coll. (1961 - 30) observent des inclusions intranucléaires éosinophiles avec les types 5 et 6 au début de l'infection. Puis la masse centrale basophile se constitue. Autour de la masse centrale on peut voir des formes cristallines.

δ — Cellules de reins de singe.

PRIER et coll. (1958 - 273) ont fait une étude très détaillée des lésions créées par les adénovirus d'origine humaine types 2 et 7 et de 8 souches d'origine simienne sur cellules de reins de singe.

Pour les adénovirus d'origine humaine, ils distinguent 3 groupes :

— *Groupe 1* : correspondant aux types 3 et 4. Augmentation du volume du noyau au cours des premières heures après l'infection du noyau. Dans beaucoup de noyaux, on voit un corps basophile très gros, hypercoloré, en position centrale et entouré d'une zone claire. De nombreux corps granuleux ayant tendance à s'agglomérer précèdent la formation des inclusions. Dans certains noyaux, on assiste à la formation d'une masse identique à celle observée dans les cellules HeLa. Enfin, quelques cellules montrent une margination de la substance nucléaire avec accumulation centrale de matériel éosinophile et formation de structure radiée. Ceci correspond probablement à la structure en nids d'abeille des cellules HeLa observées par BARSKI.

— *Groupe 2* : correspondant au type 7. Pas d'augmentation de volume du noyau. Présence de granulations éosinophiles. Dans certaines cellules, concentration du matériel nucléaire à la périphérie. Les masses centrales éosinophiles ont des connections avec la périphérie.

— *Groupe 3* : correspondant aux types 2, 5 et 6. Distorsion de la cellule. Augmentation faible du volume du noyau dont les membranes se voient mal et sont irrégulières. Margination du matériel nucléaire avec tendance à la raréfaction de la zone claire du noyau et de la masse centrale et présence d'inclusions basophiles. Dans les cellules infectées âgées, plus de structure normale, nucléoplasme et cytoplasme deviennent confluent, on voit apparaître de grosses vacuoles.

Les adénovirus provenant du singe créent sur les cellules rénales de singe des altérations analogues à celles observées avec les adénovirus d'origine humaine.

Le virus SV 17 donnerait des lésions correspondant à celles observées avec le type 1, SV 1 à celles du type 7, SV 27 à celles des types 3 et 4.

Avec les autres virus on observe ou non une augmentation de volume du noyau, des granulations éosinophiles ou basophiles remplacées peu à peu par une masse centrale basophile fortement colorée. Dans quelques cas le pourtour de cette masse centrale se vacuolise. Le cytoplasme est généralement faiblement coloré et peut lui aussi se vacuoliser.

Les travaux de LÉPINE et coll. (1957-211) sur une souche de type 7a, confirment ceux de PRIER et coll. (1958-273).

ε — Cultures d'explants.

Des préparations colorées de fibroblastes obtenues à partir de cultures d'explants (poumons humains, tissus adénoïdes, tissus d'embryon humain ou tissus d'animaux) ont permis de montrer que les modifications observées sont essentiellement nucléaires. Le noyau apparaît gonflé et de forme irrégulière. La membrane nucléaire est presque invisible, cet aspect est dû à l'accumulation de la chromatine disposée en grains fins près de la membrane. La chromatine a tendance à se fragmenter et à se surcolorer. Au sein des éléments de chromatine surcolorée, on observe quelquefois des zones acidophiles entourées d'un halo brillant. Il arrive qu'on voit des corps acidophiles libres dans le cytoplasme surtout dans les cultures montrant des lésions avancées du noyau.

Les cellules non infectées présentent quelquefois des corps acidophiles plus pâles que les cellules infectées.

Ce sont les travaux de ROWE et coll. (1953 - 293), HILLEMAN et coll. (1954 - 166), KJELLEN (1955 - 191), BALDUCCI et coll. (1956 - 12).

ζ — Notion d'une évolution de type cyclique.

L'ensemble de ces résultats ont permis à certains groupes d'auteurs de dégager une succession des différentes lésions observées au cours de l'infection des cellules.

BOYER et coll. (1959 - 39 ; 1960 - 40) mettent en évidence 5 stades successifs résumant la réponse des cellules HeLa ou amniotiques humaines soumises à l'agression des adénovirus type 5 ou 7.

Pour les cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5, on reconnaît :

Stade 1 : 8 à 10 heures après l'infection, apparition d'inclusions éosinophiles. Ces inclusions deviennent très abondantes de 10 à 18 heures.

Stade 2 : les modifications typiques s'observent de 18 à 21 heures après l'infection. Des inclusions basophiles se forment à partir des inclusions éosinophiles. Il apparaît quelquefois un anneau clair autour de l'inclusion. La chromatine s'arrange en réseau autour des inclusions et les noyaux augmentent de volume.

Stade 3 : quelques noyaux atteignent ce stade 17 heures après l'infection, mais la plupart de 22 à 24 heures. On voit apparaître des masses cristallines dans les espaces entre la chromatine et les inclusions.

Stade 4 : ce stade peut être atteint 19 heures après l'infection par certains noyaux. Le maximum de lésions correspondant à ce stade s'observe à 30 heures. Les inclusions sont basophiles. On remarque dans le noyau des barres cristallines.

Stade 5 : 48 heures après l'infection, les cellules se détachent du verre. Les membranes nucléaires présentent souvent des granules sombres et le cytoplasme des aspects dégénératifs.

Les cellules amniotiques présentent les mêmes modifications globales. Les délais d'apparition des altérations typiques sont retardés : stade 1, 24 heures après l'infection ; stade 3, 48 à 96 heures ; au stade 4, les cristaux qui apparaissent sont plus fins et longs, on remarque dans le noyau et le cytoplasme des cristaux polygonaux semblables à ceux rencontrés dans le groupe des adénovirus types 3, 4 et 7.

La réponse des cellules HeLa à l'adénovirus type 7 est comparable à celle observée pour l'adénovirus type 5. Les stades décrits ci-dessus sont moins nets. Avec les cellules amniotiques les réponses sont plus lentes.

BOYER et coll. (1959 - 38) rapportent également le cycle des modifications des cellules HeLa soumises à l'agression de l'adénovirus type 4. Ils décrivent des stades dont les caractères sont proches de ceux donnés pour les types 5 ou 7.

NASZ et coll. (1959-244) observent les cellules de reins d'embryon humain infectées par l'adénovirus type 5. Ils décrivent 5 stades successifs ; rappelant ceux énoncés par BOYER et coll. (1959-39 ; 1960-40). Le stade 1 se rencontre fréquemment de 16 à 30 heures, le stade 2 de 30 à 45 heures, le stade 3 de 40 à 50 heures, le stade 4 de 45 à 60 heures et le stade 5 de 60 à 75 heures. GODMAN et coll. (1960-143) étudiant la réponse des cellules HeLa ou Hep2 à l'agression de l'adénovirus type 5, mettent en évidence un cycle dont les stades rappellent ceux décrits plus haut.

Ces études faites sur cellules colorées au GIEMSA ou à l'hématéine-éosine donnent des résultats qui recoupent les examens des cellules vivantes au contraste de phase. Ce sont les travaux de LEUCHTENBERGER et coll. (1957-213), BOYER et coll. (1959-38 ; 1959-39), GODMAN et coll. (1960-143).

ARMSTRONG et coll. (1959-8) posent le problème des artéfacts dus à la fixation des cellules. Les auteurs montrent comment on parvient à des inclusions nucléaires typiques des adénovirus, avec l'adénovirus type 6, selon les fixateurs utilisés. Il semble que la fixation à l'acide osmique ne provoque pas de modifications trop importantes. Cependant, les travaux d'ARMSTRONG et coll. (1960-9) utilisant la fixation à l'acide osmique et à l'alcool confirment les résultats des autres auteurs.

Les noyaux et les cytoplasmes des cellules amniotiques présentent également à un stade terminal les cristaux polygonaux caractéristiques des adénovirus types 3, 4 et 7.

Nos travaux menés parallèlement à ceux des autres auteurs, ont abouti à des résultats comparables quant à la réponse des cellules HeLa, T1 ou amniotiques lorsqu'elles sont soumises à l'agression d'un adénovirus.

η — Problème de la cristallisation.

La présence de formes cristallines semble bien due à une réponse de la cellule à un type d'adénovirus car les cristaux ne se rencontrent pas avec tous les types. Les types 4 et 7 provoquent la formation de cristaux différents de ceux du type 5. BETZ et coll. (1961-30) observent des formations cristallines dans les cellules T1 infectées par les types 5 et 6. Aucun auteur n'a noté la présence de cristaux dans les cellules non infectées.

D'autres virus, que les adénovirus, ont provoqué la formation de cristaux dans les cellules. BAKER et coll. (1960-11) signalent la présence de cristaux dans les noyaux des cellules amniotiques humaines infectées par le virus de rougeole. LEADER et coll. (1960-205) observent des cristaux intranucléaires dans les cellules de reins de chien infectées par le virus de l'hépatite. FOGH et coll. (1959-118 ; 1960-119), STUART et coll. (1960-317) obtiennent la formation de cristaux dans le cytoplasme de cellules infectées par des virus entériques tels que le virus de la poliomyélite, coxsackie ou écho.

Il semble que de faibles modifications de culture puissent aboutir au phénomène de cristallisation. C'est ainsi que TENENBAUM (1959-323) observe des formations cristallines dans les cellules de reins de singe infectées par le virus de la poliomyélite lorsque la température d'incubation est ramenée de 35°C à 22°C ou 30°C.

Il apparaît également que la formation de cristaux soit due à une infection virale, car ils s'observent même dans les cellules végétales infectées par un virus (THALER, 1960 - 324 ; KENDA, 1960 - 189).

b) *Lésions morphologiques non spécifiques :*

Tous les auteurs sont d'accord pour décrire 2 types de lésions morphologiques : l'aspect de type « toxique » et l'aspect de type métabolique.

La dégénérescence cellulaire du type métabolique se reconnaît facilement grâce à l'introduction dans chaque expérience de cellules maintenues en survie non infectées. Ces cellules doivent rester en bon état pendant la durée de l'expérience.

La dégénérescence cellulaire du type « toxique » a été fréquemment observée par les différents auteurs. Elle a lieu très souvent lorsque la dose de virus est élevée. Nous avons vu qu'il a été possible d'isoler une fraction protéique responsable des modifications précoces. Ces modifications particulières ont pu être observées par BOYER et coll. (1957 - 37 ; 1959 - 38), NASZ et coll. (1959 - 243). Les descriptions relatées, recoupent celles que nous avons faites. Pour éliminer cet effet précoce, les auteurs utilisent des suspensions virales traitées par la trypsine. Il arrive cependant que des modifications du type « toxique » soient observées après utilisation de fortes doses de virus purifié par la trypsine avec le type 14 (DENNY et coll., 1961 - 68).

c) *La cellule révélatrice de la nature d'un virus :*

Diverses études ont été faites sur la nature de la lésion observée dans les cellules infectées par adénovirus. Les différentes méthodes utilisées tendent à montrer que les lésions observées varient selon le type de virus : virus poliomyélitique, virus de l'herpès, de la vaccine, de la rougeole, des oreillons par exemple. Il a été possible à LELONG et coll. (1956 - 206) de retrouver dans des cellules de poumon d'un enfant infecté par un adénovirus, des altérations nucléaires rappelant celles observées sur cultures de cellules.

De même, VERVILLE et coll. (1961 - 331) réalisant une double infection des cellules de reins de singe ou des cellules KB par le virus CA et l'adénovirus, identifient facilement les 2 types de lésions cellulaires obtenues.

De même, HOLZAEFFEL et coll. (1957 - 169) utilisent l'adénovirus type 3 provoquant des lésions cellulaires facilement reconnaissables, comme agent empêchant le développement des cellules cancéreuses.

PIERCE et coll. (1960 - 270) décrivent des inclusions dues aux adénovirus dans les cellules épithéliales ciliées du système respiratoire alors qu'ils recherchent des formations spéciales, les ciliocytophthoria.

3) **Résumé.**

Tous les auteurs et nous-mêmes, sommes d'accord pour dire que les cellules répondent à l'agression par l'adénovirus en donnant

des lésions nucléaires facilement reconnaissables. Il est difficile de dire si ces lésions correspondent à la synthèse du virus dans la cellule ou simplement à des manifestations non spécifiques de destruction cellulaire ou encore à des activités métaboliques anormales de la cellule infectée (NASZ et coll., 1959 - 243).

Un argument en faveur de la synthèse du virus dans la cellule est le passage de l'acidophilie des granules précoces à la basophilie intense des masses centrales. Ces granules ont été parfaitement reconnus et identifiés au microscope électronique, mais on ignore encore leur rôle exact (GODMAN et coll., 1960 - 143).

B. — ETUDES CYTOCHIMIQUES

Si de nombreux travaux ont été effectués sur les adénovirus, on trouve peu d'études cytochimiques.

1) Etude des acides nucléiques.

Deux méthodes ont pu être utilisées : la coloration au vert-de-méthyle-pyronine et la coloration par la réaction de FEULGEN.

a) Coloration par le vert-de-méthyle-pyronine :

La coloration au vert-de-méthyle-pyronine a été peu utilisée. BARSKI (1956 - 17), BARSKI et coll. (1958 - 22) confirment par cette coloration les résultats obtenus par coloration au GIEMSA ou à l'hématéine-éosine. Les inclusions éosinophiles apparaissent « vert-de-méthyle positives sur un fond coloré par la pyronine avec une intensité changeante ».

GODMAN et coll. (1960 - 143) établissent la corrélation entre les colorations obtenues et les aspects morphologiques décrits avec l'adénovirus type 5.

Au début de l'infection, les granules acidophiles sont chromophobes, ils sont gris-roses. Aux stades suivants, les agrégats acidophiles ou les masses centrales se colorent comme le DNA. Les cristaux et la matrice sont diffus et ne se colorent pas.

Ainsi, par cette méthode, nous voyons se succéder les différents stades des modifications cellulaires au cours de l'infection. Les observations des auteurs confirment celles que nous avons faites. Les acides nucléiques se modifient considérablement. Il apparaît une augmentation nette de la teinte verte correspondant à l'accumulation de DNA dans la cellule.

Les auteurs ne signalent pas d'augmentation de la pyroniphilie cytoplasmique et nucléaire au début de l'infection ; probablement parce que les conditions techniques sont différentes : colorant, purification du colorant. GAY (1961 - 131) fait une étude critique sur les possibilités de localiser les acides nucléiques et les protéines dans les cellules. Pour la localisation des acides nucléiques, il est nécessaire de traiter les préparations par les nucléases et ensuite de les colorer par un colorant basique. Lorsqu'il s'agit de nucléoprotéines, traitement par les nucléases puis coloration par des colorants acides qui se combinent avec les protéines basiques. La détermination des acides nucléiques peut se faire par coloration avec le vert-de-méthyle-pyronine après

traitement par les nucléases. Un traitement par la désoxyribonucléase fait disparaître la coloration verte, la coloration rouge due à la pyronine disparaît par traitement à la ribonucléase. L'auteur montre dans quelles conditions la coloration verte est diminuée lorsque la préparation est traitée par la ribonucléase ou à pH alcalin ou à la température de 60°C.

Il semble bien que l'augmentation de RNA soit réelle puisqu'elle se retrouve dans les résultats d'extraction d'acides nucléiques (voir 2^e partie).

L'examen en contraste de phase des préparations colorées au vert-de-méthyle-pyronine nous a permis de mettre en évidence les modifications nucléolaires (vacuolisation et densification) et les variations pyroninophiles extranucléaires.

On sait que le nucléole est en continuelle modification morphologique (FRÉDÉRIC, 1958 - 123 ; FICQ, 1959 - 111 ; LETTRE et coll., 1961 - 212). Cependant il semble que la densification soit en relation avec la période terminale de la formation de la masse centrale. Au contraire la vacuolisation est un phénomène précoce.

On peut se demander si certaines ribonucléoprotéines qui auraient un rôle dans l'organisation du noyau en mitose, ne seraient pas capables de jouer un rôle analogue dans le noyau infecté.

b) Coloration par la réaction de Feulgen :

La répartition des acides nucléiques a été essentiellement étudiée en utilisant la réaction de FEULGEN.

Les cellules non infectées ne montrent pas d'altérations caractéristiques. Les membranes nucléaires sont fines, les granules présents dans le nucléoplasme sont FEULGEN négatifs sauf dans les régions avoisinant les nucléoles. Ceux-ci, en effet, sont entourés d'une zone FEULGEN positive. Certains noyaux sont plus petits les uns que les autres et très fortement colorés. Ce sont les observations de HARFORD et coll. (1956 - 158), BOYER et coll. (1957 - 37).

HARFORD et coll. (1956 - 158) observent des cellules HeLa infectées par les adénovirus types 1 à 4. Les noyaux sont disposés en petits paquets et sont très colorés. Certains noyaux contiennent de gros corps intranucléaires entourés d'une zone claire. Ils se distinguent des autres par la perte de granules dans le nucléoplasme et une épaisseur faible et irrégulière.

BOYER et coll. (1957 - 37) notent très rapidement dans les cellules infectées par les adénovirus types 1 et 2 une accumulation d'inclusions et de granules FEULGEN négatifs pouvant devenir positifs. Avec les adénovirus types 3 et 4 ils observent une accumulation d'agrégats et de masses d'apparence cristalline. La masse centrale qui se forme est fortement FEULGEN positive.

MORGAN et coll. (1956 - 236), BLOCH et coll. (1957 - 33) signalent l'importance des agrégats de particules virales qui sont FEULGEN positives avec les adénovirus types 3, 4, 5 ou 7. La positivité de la réaction de FEULGEN traduit la présence de DNA. Il y aurait une augmentation nette de DNA au cours de la multiplication du virus. Les auteurs pensent qu'il y aurait un déplacement

de chromatine nucléaire et par conséquent le DNA serait un constituant de la particule virale.

BARSKI (1956 - 17), BARSKI et coll. (1958 - 22), NASZ et coll. (1960 - 244), rapportent des observations analogues avec différents types d'adénovirus humains. DEFENDI (1960 - 65) observe des inclusions spécifiques FEULGEN positives dans des cultures de cellules infectées par le virus GAL de la poule. Il met ainsi en évidence un accroissement considérable de DNA des noyaux infectés.

La coloration au bromure azur B combinée à la réaction de FEULGEN a permis de distinguer le DNA viral nouvellement formé et le DNA provenant de la cellule-hôte. Ce sont les études de BLOCH et coll. (1957 - 33), GODMAN et coll. (1960 - 143).

L'ensemble des travaux utilisant la réaction de FEULGEN traduisent encore la notion d'une évolution de type cyclique. BOYER et coll. (1959 - 39), GODMAN et coll. (1960 - 143) rapportent les stades suivants, avec l'adénovirus type 5 :

Stade 1 : 8 à 10 heures après l'infection un faible pourcentage de cellules contiennent des inclusions éosinophiles. La majorité de ces inclusions sont FEULGEN négatives. Dans quelques cas, ces inclusions sont faiblement FEULGEN positives.

Stade 2 : 14 à 21 heures après l'infection, les inclusions éosinophiles se réunissent, l'ensemble devient basophile. La réaction de FEULGEN est faiblement positive. Il apparaît une zone claire autour de l'inclusion. La chromatine se réarrange autour des inclusions et les noyaux sont gonflés.

Stade 3 : 17 à 24 heures après l'infection, apparition de masses cristallines anguleuses, éosinophiles, FEULGEN négatives dans l'espace compris entre les inclusions et la membrane nucléaire. Le noyau continue à augmenter de volume.

Stade 4 : 19 à 30 heures après l'infection. Les inclusions rondes sont basophiles et FEULGEN positives. Les cristaux restent FEULGEN négatifs.

Stade 5 : 48 heures après l'infection les cellules se détachent du verre et les détails morphologiques se distinguent mal.

Avec l'adénovirus type 7, BOYER et coll. (1959 - 39) notent quelques différences. Au stade 1, les inclusions peuvent être soit FEULGEN négatives, soit FEULGEN positives. Au stade 2, les granules sont FEULGEN positifs. Au stade 3, la masse centrale est FEULGEN positive et les nucléoles disparaissent. Le stade 4 présente des masses centrales FEULGEN positives entourées d'une zone claire où se trouvent les masses cristallines basophiles et FEULGEN positives.

Les cristaux qui entourent la masse centrale peuvent être FEULGEN négatifs ou FEULGEN positifs selon les types. C'est ainsi qu'avec l'adénovirus type 3, ils peuvent être tantôt négatifs, tantôt positifs selon la quantité de DNA. Avec l'adénovirus type 5, les barres cristallines sont rarement FEULGEN positives. Avec les types 4 et 7, ils sont variables. Ce sont les travaux de LEUCHTENBERGER et coll. (1957 - 213), BLOCH et coll., (1957 - 33), BOYER et coll. (1959 -

39 ; 1960 - 40), NASZ et coll. (1960 - 244), GODMAN et coll. (1960 - 143).

Nos propres résultats obtenus par la réaction de FEULGEN recoupent ceux obtenus avec le vert-de-méthyle-pyronine et ceux obtenus par les autres auteurs tant en ce qui concerne le développement des lésions intranucléaires qu'en ce qui concerne la relation entre les structures éosinophiles et l'accumulation de matériel FEULGEN positif.

Nos résultats sur le matériel contenu dans les « pétales » et les cristaux sont moins détaillés. Cependant nous avons trouvé des cristaux FEULGEN positifs avec l'adénovirus type 4 et des cristaux Feulgen négatifs avec l'adénovirus type 5.

c) *Fluorescence directe :*

Peu d'auteurs utilisent la technique de fluorescence directe.

BERTALANFFY et coll. (1956 - 28) et ARMSTRONG (1956 - 7) proposent l'utilisation de l'acridine orange pour l'étude de la localisation du RNA et du DNA dans la cellule. KEEBLE et coll. (1962 - 187) confirment la spécificité des réactions.

ARMSTRONG et coll. (1959 - 8) rapportent leurs observations sur cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 6. Ils décrivent une séquence des modifications nucléaires semblables à celle observée pour d'autres types d'adénovirus et à celle décrite en utilisant l'observation au contraste de phase. La fluorescence varie en fonction du DNA présent dans les noyaux.

Nous donnerons les différents stades de la séquence des lésions observées par CORSI et coll. (1960 - 54) après infection des cellules KB par l'adénovirus type 5.

Les cellules non infectées ont un cytoplasme émettant une fluorescence rouge orangée due à la présence de RNA. Le noyau paraît homogène et émet une fluorescence vert pâle, caractéristique de DNA. Il arrive que le noyau soit entouré d'une bande mince de fluorescence jaune.

Les cellules infectées présentent des modifications très rapidement. Douze à 24 heures après l'infection le cytoplasme peut paraître plus dense, le noyau augmente de volume et contient de nombreux grains verts. Une bande claire fluorescente sépare le noyau du cytoplasme. On peut penser que cette bande est due à l'action du fixateur. Or les cellules non infectées dans les mêmes conditions de fixation ne présentent pas d'altération. Sans doute l'infection introduit-elle les modifications de la membrane nucléaire.

Plus tard, 35 à 48 heures après l'infection, les lésions nucléaires apparaissent de plus en plus nombreuses. De grosses vésicules entourent le noyau. Le matériel nucléaire se présente sous forme de boules arrondies émettant une fluorescence vert-brillante. Le cytoplasme tend soit à devenir granuleux, soit à présenter des formations polygonales fluorescentes en relation avec la bordure du cytoplasme par des fins prolongements.

Dans les zones qui contiennent du DNA caractérisées par une fluorescence verte, par les vésicules et la réduction du cytoplasme,

on note une fluorescence rouge orange. Cette fluorescence traduit la présence de RNA. Le traitement par la ribonucléase supprime cette coloration rouge-orange sans modifier la coloration verte du DNA. Au centre du noyau se constitue une masse centrale verte.

La fluorescence verte émise par le DNA nucléaire devient homogène au fur et à mesure que l'infection progresse. Elle est différente de la fluorescence émise par le DNA des cellules non infectées. Un traitement par l'acide chlorhydrique fait apparaître une fluorescence rouge brillante dans les cellules infectées. Le DNA provenant de la multiplication virale apparaît différent du DNA des cellules non infectées. On ne sait pas si ce DNA particulier représente le virus lui-même ou s'il est formé par la cellule en réponse à l'infection.

Au niveau de la masse centrale, EPSTEIN et coll. (1960 - 100) observent une fluorescence rouge lorsqu'ils utilisent le fixateur de CARNOY ou un fixateur contenant du mercure. La même fluorescence rouge-orange subsiste, si les préparations sont digérées par la ribonucléase ou la désoxyribonucléase. La fluorescence rouge disparaît et devient verte lorsque les préparations sont traitées en milieu alcalin pendant 2 heures ; elle est complètement détruite lorsque les préparations sont traitées pendant 2 heures en milieu alcalin puis 2 heures en présence de désoxyribonucléase.

Il apparaît ainsi que le DNA est présent dans les particules d'adénovirus.

2) Etude des protéines.

Différentes études ont été faites sur la répartition des protéines au cours de l'infection ou la structure chimique des masses cristallines.

GODMAN et coll. (1960 - 143) rapportent leurs observations selon les stades décrits précédemment.

Dans les premiers stades de l'infection, la présence des groupements aminés lysine, arginine, histidine est démontrée par la réaction au jaune naphthol S. La réaction à la ninhydrine-SCHIFF traduit la présence de groupements terminaux NH_2 . La réaction aux sels de tétrazonium confirme la présence d'acides aminés cycliques, tyrosine par exemple. Le test de SAKAGUCHI révèle la présence d'arginine, les granules acidophiles n'en contiennent pas.

Aux stades suivants, après traitement des cultures par l'acide trichloracétique, avec le tests de SAKAGUCHI, la réaction est fortement positive pour l'arginine. Avec le virus GAL de la poule, les réponses des inclusions sont fortement positives avec le réactif de SCHIFF, après la ninhydrine et les sels de tétrazonium. Elles ne se colorent pas avec les réactifs spécifiques des protéines du type histone. Ce sont les travaux de DEFENDI (1960 - 65).

Il ressort des différentes études des protéines sur les cristaux (MORGAN et coll., 1957 - 238 ; GODMAN et coll., 1960 - 143), que les réactions pour les acides aminés aromatiques sont faiblement positives. La réaction de MILLON traduit la présence de tyrosine, le test à l'acide flavinique la présence de lysine, et le test de

SAKAGUCHI la présence d'arginine. L'acide périodique-SCHIFF ne donne pas de coloration.

Nos travaux sur l'identification et la localisation des protéines dans la cellule infectée paraissent moins détaillés que ceux de GODMAN et coll. (1960 - 143). Ils nous permettent cependant de confirmer la nature protéique des cristaux sans apporter de possibilité de raffinement dans l'analyse de leur constitution par rapport aux autres protéines présentes dans le noyau.

3) Etude des sucres.

GODMAN et coll. (1960 - 143) n'ont pas décelé la présence de sucres dans les granules basophiles, dans la masse centrale, au niveau des « pétates » ou des cristaux.

Nos propres recherches à ce sujet ne montrent pas de réaction positive anormale. Elles indiquent que sa répartition dans la cellule normale, en particulier au niveau du nucléole et du fuseau mitotique, se retrouve dans la cellule infectée au niveau du nucléole et de la masse centrale.

La comparaison entre la répartition des zones positives au réactif de SCHIFF après ninhydrine et celle qui s'est révélée par la pyronine, paraît montrer qu'il existe une organisation ribonucléoprotéique avant et pendant la mitose normale qui rappelle d'une certaine manière l'organisation topographique de ce matériel dans la phase de début de l'infection.

4) Etude des lipides.

HARFORD et coll. (1956 - 158) mettent en évidence la nature lipidique des granules cytoplasmiques par une coloration à l'huile rouge O. Ces granules sont plus gros quand les cellules sont dans du milieu sans sérum pendant deux jours alors que les granules denses vus au microscope électronique sont inchangés.

GODMAN et coll. (1960 - 143) ne signalent pas d'observation particulière au niveau du cytoplasme ou des noyaux de cellules infectées, au sujet des substances lipidiques.

De plus, HARFORD et coll. (1956 - 158) n'observent que les mitochondries de cellules infectées dans une zone paranucléaire. Les auteurs se demandent si le cytoplasme ne participerait pas à la multiplication virale.

5) Etude enzymatique.

A notre connaissance, il n'y a pas eu d'études faites sur les enzymes des cellules infectées par les adénovirus.

L'étude des activités phosphatasiques acide qui vient d'être abordée mérite d'être poursuivie et complétée par des études de phosphatases alcalines non spécifiques et phosphatases alcalines spécifiques. Certains travaux, tels que ceux de KOVACS (1956 - 214) expriment les variations des activités phosphatasiques des cellules au cours de l'infection par le virus poliomyélique. L'activité phosphatasique acide passe par un maximum avant d'être nulle.

Par contre l'activité des phosphatases alcalines décroît pendant la phase précoce. Kovacs et coll. (1960 - 201) montrent l'importance des variations enzymatiques au cours du métabolisme cellulaire.

En réalité, si une étude systématique des activités enzymatiques de la cellule infectée représente un domaine de recherches à explorer, nous n'avons pas étudié les phosphatases acides dans cet esprit. On sait en effet, depuis les travaux de DE DUVE et coll. (1956 - 64), NOVIKOFF (1959 - 248 ; 1961 - 249), que les activités des protéinases et des nucléases sont concentrées au niveau de particules identifiées par ultracentrifugation que DE DUVE a proposé d'appeler lysosomes. Ces particules n'appartiennent ni à la fraction mitochondriale ni à la fraction microsomiale. Leur rôle éventuel dans la dégradation d'un matériel contenant une coque protéique et des acides nucléiques rassemblés au sein de cette coque est au moins à envisager.

Or il se trouve que ces mêmes lysosomes apparaissent comme exclusivement porteurs, en plus des systèmes enzymatiques des protéinases et des nucléases des lieux d'activité phosphatasique en milieu acide. La révélation de ces lieux d'activité des phosphatases acide peut donc être utilisée comme un moyen d'apprécier la répartition intracytoplasmique des lysosomes au cours de l'infection.

De plus, ces lysosomes dont la taille varie de 0,5 à 2 μ , une fois colorés sont appréciables en microscopie ordinaire et de ce fait peuvent être étudiés par microcinématographie. En conséquence, l'emploi des réactions cytochimiques d'après GOMORI et d'après GREEN et VERNEY, ne nous ont pas servi à autre chose, qu'à tracer les variations éventuelles de la répartition des lysosomes dans les cytoplasmes.

On constate que cette répartition intracytoplasmique varie dans le sens d'une concentration dans la zone golgienne, tout se passant comme si les lysosomes situés à la périphérie venaient au moins dans certains cas se concentrer dans cette zone. Nous verrons par microcinématographie, que d'importants remaniements de la zone golgienne surviennent en relation avec l'effet « toxique » de la suspension virale sur les cellules au début de l'infection.



CHAPITRE II

RESULTATS ACQUIS PAR LES ETUDES DYNAMIQUES

L'enregistrement microcinématographique a permis d'étudier la cinétique des modifications cellulaires observées au cours des études statiques. Les cultures cellulaires ont été, soit sur lamelles retirées des tubes et montées dans la chambre de ROBINEAUX, soit sur les lamelles de la chambre de CRUICKSHANK. Les adénovirus en cause ont été, soit le type 1, soit le type 5. Deux montages optiques de contraste de phase ont été utilisés : système interférentiel de NORMANSKI et système à anneaux.

A un fort grossissement, avec le système interférentiel, les cellules T1 témoins ont un cytoplasme immobile sur les bords, granuleux autour du noyau. Quelques granules s'agitent de façon désordonnée dans le cytoplasme. Les cellules sont ordinairement arrangées par plages de 2 à 10 éléments juxtaposés en mosaïque. Parfois une cellule se sépare de la plage épithéliale par un étirement lent et régulier. Il y a ségrégation. Normalement les cellules ségrégées présentent un bouillonnement lent et régulier à petites bulles. Quelquefois le bouillonnement est intense et la cellule émet des expansions bulbeuses, digitiformes ou filiformes, pendant des heures, sans que mort ni division s'en suivent.

Des cellules T1 cultivées dans les chambres de CRUICKSHANK et infectées par l'adénovirus type 5 (lot 5-1491) à raison de 10 DICT50 pour 60.000 cellules ont permis de suivre la formation de la masse centrale qui se constitue au sein du noyau et l'apparition des cristaux.

Il est très difficile de filmer de bout en bout l'apparition et le développement des lésions cellulaires qui résultent de l'infection par adénovirus pour différentes raisons :

- peu de cellules présentent les modifications observées par rapport à l'ensemble de la culture. Il est donc nécessaire que les lésions apparaissent dans la zone que l'on doit filmer ;

- les cellules cultivées en chambres de ROBINEAUX ou de CRUICKSHANK ne sont pas tout à fait dans les mêmes conditions que dans les tubes de culture servant aux observations globales de populations cellulaires. Il importe donc de se placer dans des conditions telles que la dégénérescence ait lieu dans des conditions reproductibles. Ceci n'a été possible que dans les chambres de CRUICKSHANK, en raison du principe même de constitution de ce type de chambre (voir page 25) ;

- la caractéristique des adénovirus est de provoquer l'arrondissement des cellules infectées, ce qui les rend impropres à l'observation détaillée au contraste de phase. Il faut donc se placer dans des conditions telles que l'arrondissement des cellules n'ait pas lieu ;

- les modifications de pression, les courants liquides qui s'établissent au cours de changement de milieu des cellules doivent

être évités afin que les cellules « rondes » se détachent de la lamelle et ne viennent se placer dans la zone filmée.

I. — RESULTATS.

De bonnes observations ont pu être réalisées dans les chambres de CRUICKSHANK dans lesquelles le virus est introduit à une dilution telle que les lésions apparaissent vers 90 à 100 heures au lieu de 48 à 72 heures dans les tubes à lamelle.

A. — ETUDE DE LA MORT CELLULAIRE PAR EFFET SPECIFIQUE DU VIRUS

1) Formation de la masse centrale.

De 40 à 42 heures après l'introduction du virus, on n'observe pas de modifications visibles dans la cellule. Puis entre 43 et 48 heures, on voit apparaître une zone grise au sein d'un noyau qui augmente de volume. De 50 à 53 heures, le noyau de la cellule contient 3 à 5 grains périnucléolaires. La zone grisâtre intranucléaire est nettement individualisée.

Entre 60 et 62 heures, la zone grise prend l'aspect d'un réseau typique. La membrane nucléaire se festonne et le noyau contient de nombreux grains mobiles. L'ensemble du noyau présente une fluidité anormale.

De 68 à 70 heures, on voit une grande inclusion grise dans le noyau à bords nets respectant bien les nucléoles. Une sorte de fossé clair sépare la masse grise du nucléole. Une zone claire apparaît entre la membrane nucléaire et la masse grise. Dans cette zone, quelques grains noirs sont animés de mouvements browniens. Dans le cytoplasme, les mitochondries sont peu nombreuses, courtes et épaisses et présentent des mouvements de va-et-vient en bordure de la membrane nucléaire.

Entre 77 et 78 heures, la zone grise centronucléaire granuleuse se densifie. Elle est séparée de la membrane nucléaire par une zone claire et fluide. Cette zone se découpe en logettes de forme rectangulaire. La membrane nucléaire présente des incisures plus ou moins profondes. Les nucléoles sont ronds, petits et denses, ils sont séparés de la masse centrale par un halo clair.

Entre 85 et 90 heures, le noyau a une taille double de celle qu'il avait au départ. La masse centrale est parfaitement constituée. Les espaces clairs entourent la masse centrale. Le cytoplasme ne présente pas d'altération particulière.

2) Formation des cristaux.

Nous avons pu saisir l'apparition et la disparition des cristaux au sein des cellules, lorsque la masse centrale est bien constituée vers 50 à 52 heures. Examinée au microscope à contraste de phase interférentiel, elle a l'aspect d'une éponge en relief entourée d'une zone « fluide » correspondant à la « matrice » des auteurs américains.

Dans certains cas, vers 58 à 60 heures, la zone fluide s'orga-

nise en barres ayant une allure cristalline et des bords nets. Ces barres n'ont aucune structure et paraissent présenter parfois une section en polygone irrégulier.

Nous avons pu voir un cristal s'organiser peu à peu à partir de la zone fluide à l'intérieur des festons de la membrane nucléaire en 70 à 100 minutes. Ces formations cristallines sont instables et peuvent disparaître dans certains cas. Nous avons ainsi observé la rétraction d'une cellule qui présentait des cristaux et la disparition des cristaux, le tout en une heure environ.

3) Résumé.

Les modifications observées sont essentiellement nucléaires. Elles correspondent à un type de mort cellulaire par formation d'une volumineuse inclusion intranucléaire. Ces observations recourent celles qui sont rapportées plus haut. Elles représentent le déroulement de « l'effet viral type ».

B. — ETUDE DE LA MORT CELLULAIRE PAR EFFET NON SPECIFIQUE DU VIRUS

En opposition avec le type de mort par inclusion intranucléaire ou « effet viral type », on observe un autre type de mort cellulaire, sans inclusion intranucléaire caractéristique.

Parfois en effet, des lésions s'observent dans les premières heures après l'introduction du virus. Les cellules s'arrondissent et tombent dans le milieu de culture. Il n'y a pas eu multiplication du virus comme le prouvent les méthodes quantitatives indirectes. La formation de la masse centrale typique n'a pas lieu.

Si l'on enregistre les mouvements cellulaires avant et après introduction du virus on s'aperçoit que 10 minutes après l'introduction du virus, l'agitation cytoplasmique de bordure est augmentée. Elle évoque l'activité d'un voile de pinocytose. Des vacuoles apparaissent dans une zone juxtanucléaire. Le volume du noyau et des nucléoles augmente, le cytoplasme présente de petites protrusions sur ses faces latérales.

Entre 16 et 28 heures, le volume du noyau n'augmente plus, les nucléoles se modifient. Les vacuoles apparues en dehors de la zone de GOLGI sont agitées de mouvements de va-et-vient. Certaines apparaissent en bordure du cytoplasme, d'autres disparaissent et semblent se fondre dans la zone golgienne. Cette zone apparaît, du reste, très hypertrophiée.

Entre 28 et 44 heures, le volume du noyau n'augmente pas mais celui de la zone golgienne augmente considérablement. Autour de cette zone claire, des vacuoles continuent d'apparaître et de disparaître. A un certain moment, vers 35 heures, il est impossible de préciser la limite entre le noyau et le cytoplasme. Une ombre s'établit à cheval sur la membrane nucléaire, progressivement elle se déplace et devient extranucléaire.

De 44 à 46 heures, on assiste à la rétraction de la cellule, le noyau diminue considérablement de volume. Puis la cellule se met en bouillonnement et meurt.

Il n'y a pas eu d'altérations typiques du noyau. Les modifications observées sont essentiellement cytoplasmiques. Elles représentent un type de mort cellulaire par « effet toxique ».

C. — ETUDE DES MODIFICATIONS DE SURFACE CELLULAIRE OBSERVEES AU COURS DE L'INFECTION

Les cellules infectées par un adénovirus s'arrondissent. Cet arrondissement des cellules est considéré comme caractéristique. L'utilisation du système à contraste de phase interférentiel NOMARSKI nous a permis l'étude des surfaces cellulaires.

Pendant les 2 premières heures de l'infection, les cellules apparaissent à peu près normales. Les mitoses ont lieu, le cytoplasme semble immobile. Si au bout de 5 heures de contact cellules-virus, le milieu de-culture est remplacé par du milieu neuf, on observe des rétractions cellulaires rapides, des mouvements de la périphérie du cytoplasme très rapides. Après 24 heures, les cellules reprennent leur activité normale, les cellules rondes se déplacent lentement. On assiste à un étirement et une séparation des cellules non arrondies.

Dans certains cas, 24 heures après l'infection, on observe des surfaces cellulaires irrégulières, des plages fluides lisses, à côté de plages régulièrement granuleuses. De nombreuses expansions et protrusions cytoplasmiques, renflées en massues, apparaissent à la surface du cytoplasme. Les cellules s'arrondissent, se « mettent en boule » et présentent des expansions filiformes, agitées de mouvements de balayage rapide.

La « mise en boule » survient par rétraction du cytoplasme et contraction de la masse cellulaire sans déplacement réel des cellules sur le verre.

Les cellules arrondies observées 40 heures après l'infection, ne présentent plus d'expansion ni de bouillonnement. Le bord de la cellule est hérissé de spicules fins et mobiles.

Il peut arriver qu'à ce stade les cellules présentent une vacuolisation périnucléaire endocellulaire (mort par endopotocytose).

II. — DISCUSSION.

A. — VALEUR DE LA METHODE EMPLOYEE

Quelques études microcinématographiques ont été faites pour connaître le développement d'infection virale intracellulaire : virus poliomyélitique (BARSK et coll., 1955 - 19), virus de l'herpès (FALKE et coll., 1961 - 106), virus de la rougeole (AOYAMA et coll., 1959 - 6). A notre connaissance, aucun travail n'a été présenté sur l'infection des cellules par un adénovirus.

Cette étude nous permet de suivre « in vivo » les modifications cellulaires déjà décrites. La question des fixateurs n'intervient pas.

Il ne fait pas de doute que les lésions nucléaires, en particulier la masse centrale, correspondent à la multiplication du virus. Les études cytochimiques (BOYER et coll., 1957 - 37 ; 1959 - 39 ;

1960 - 40 ; MORGAN et coll., 1957 - 238 ; GODMAN et coll., 1960 - 143 ; PRUNIERAS et coll., 1962 - 278) et immunologiques (BOYER et coll., 1959 - 38 ; CHARDONNET et coll., 1961 - 49) indiquent une accumulation de virus à ce niveau. La microscopie électronique (KJELLEN, 1955 - 191 ; LAGERMALM et coll., 1957 - 202 ; MORGAN et coll., 1956 - 236 ; 1957 - 238 ; 1960 - 241) révèle la présence de particules virales dans la masse centrale.

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude des lésions autres que les lésions nucléaires. HILLEMANN et coll. (1954 - 166) observent un arrondissement des cellules, spécifique de la multiplication du virus, et des aspects cytoplasmiques non spécifiques.

Notre étude nous a permis de mieux apprécier l'existence des effets « toxiques » sous l'angle cytologique. Nous avons vu que ces effets de type « toxique » ont été beaucoup étudiés par rapport au pouvoir infectieux, au pouvoir fixant le complément et au pouvoir hémagglutinant. Il a été montré qu'il existe un facteur B de nature protéique responsable des modifications cellulaires précoces non spécifiques. Il semble bien que les altérations cellulaires observées soient de type « toxique », car elles apparaissent très tôt et ne s'accompagnent pas de la formation de la masse centrale, dans le noyau de la cellule.

En même temps que le problème de la toxicité, se pose la question de la relation entre l'apparition de vacuoles, l'hypertrophie de la zone golgienne, le remaniement des lieux d'activité des phosphatases acides et les altérations de la zone de jonction nucléocytoplasmique.

Sachant que les lysosomes sont les supports de l'activité phosphatasique acide, protéolytique et nucléasique, on peut se demander quel est leur rôle dans la prise en charge du matériel viral. Dans notre étude cytochimique, nous avons suggéré que les remaniements nucléaires spécifiques découlaient de l'incorporation de nucléotides viraux dans les nucléotides cytoplasmiques par un système auto-entretenu du type de celui proposé par GLINOS (1959 - 142).

On peut supposer que les produits de dégradation des protéines virales s'accumuleraient dans la zone golgienne et provoqueraient des effets « toxiques ».

En effet, on sait qu'immédiatement après le contact cellules-virus, ce dernier disparaît. En particulier on ne le retrouve plus par microscopie électronique. Il faut donc admettre qu'il est bien dégradé après son entrée dans la cellule. Cette dégradation doit se faire en sous-unités protéiques et nucléiques. Or nous savons que seuls les éléments protéiques sont « toxiques ». Les sous-unités nucléiques suivraient donc ainsi deux chemins différents : les édifices nucléotidiques vers le pool cytoplasmique, les sous-unités protéiques aboutiraient au complexe golgien après cheminement dans les vésicules lysosomiales ou à travers le système canaliculaire. Un tel rôle de stockage attribué à la zone de GOLGI serait en accord avec la conception de DALTON (1961 - 58).

Nous avons tenté d'apporter quelques éclaircissements au problème des modifications des surfaces cellulaires chez des cellules pathologiques.

L'arrondissement des cellules est bien connu chez des cellules normales avant la division cellulaire. Cette « mise en boule » peut être rapportée à une perturbation de l'état physique du cytoplasme. Elle pourrait être attribuée à une gélation comme il se produit par exemple, au cours de la mitose (DEYSSON et coll., 1962 - 70), ou encore à une modification des systèmes enzymatiques du métabolisme cellulaire. On sait en effet que l'infection des cellules par adénovirus provoque une augmentation de la glycolyse (FISCHER et coll., 1957 - 112).

On a décrit des différences entre l'aspect des surfaces des cellules normales et des cellules cancéreuses (EASTY et coll., 1961 - 92 ; PAUL, 1961 - 270).

La surface des cellules cancéreuses apparaît plus granuleuse que la surface des cellules normales au microscope électronique par des techniques d'ombrage.

Les cellules infectées par l'adénovirus présentent des granulations irrégulières de taille et de forme. Le cytoplasme peut présenter des protrusions filiformes, digitiformes ou en boudin. La surface des cellules infectées est suffisamment modifiée pour que le décollement de la cellule ait lieu facilement. Il se pourrait que le facteur de détachement cellulaire de ROWE et coll. (1958 - 297) identifié aux particules B de PEREIRA, agisse en partie par l'altération de la structure physique du gel cytoplasmique.

Enfin, il nous a été possible de mettre en évidence l'apparition et la disparition des structures cristallines dans les espaces appelés « pétales » ou « matrices ». D'abord, il se constitue dans le fossé annulaire qui sépare la masse centrale de la membrane nucléaire, des masses blanches floconneuses soumises à divers mouvements de traction, d'étirement et de torsion. Puis, en quelques minutes, il se forme une barre quadrangulaire dont l'une des arêtes seulement est visible. Cette barre cristalline peut présenter un aspect variable, les arêtes apparaissent tantôt nettes, tantôt floues. Au bout d'un temps pouvant aller de 1 à 2 heures, le cristal peut disparaître complètement. Cette observation confirme celle de MORGAN et coll. (1960 - 241) en microscopie électronique. De plus, des cristaux peuvent rester en relation avec la membrane nucléaire par des sortes de cordages plus ou moins fins.

Ainsi, l'agression des cellules par un adénovirus nous a permis d'étudier 2 types de mort de la cellule et apporte quelques renseignements sur les rapports cellules-virus (WALKER, 1960 - 332).

B. — METHODES DE PURIFICATION

Si nous avons pu apporter quelques détails sur le comportement de la cellule en présence de particules virales, les résultats n'ont qu'une valeur indicative. Il conviendrait d'affiner la technique selon le conseil de PEREIRA (*) (1962). En effet, cette tentative demeure empirique car elle est essentiellement fondée sur des critères morphologiques (durée et quantité de virus).

(*) Communication orale.

Notre étude fait apparaître que les modifications cellulaires sont habituellement la résultante de deux composantes : aspect spécifique associé à la multiplication du virus et aspect non spécifique de type « toxique ».

La mise en œuvre de moyens nouveaux permettrait de dissocier les différentes particules et d'étudier leur effet propre. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour purifier les suspensions virales : la technique de précipitation et diffusion dans le gel permettant la séparation des 3 fractions A, B et C de PEREIRA et coll. (1959-266), la technique de séparation sur cellulose DEAE de PHILIPSON (1960-268), la centrifugation différentielle à haute vitesse selon HILLEMANN et coll. (1955-167), ROWE et coll. (1958-297), ZUSCHEK (1960-344). Les suspensions virales peuvent être purifiées par action de la trypsine selon la méthode proposée par PEREIRA et coll. (1957-262), EVERETT et coll. (1958-105), DENNY et coll. (1961-68), par traitement par le fluorocarbène selon la technique de GESSLER et coll. (1956-133), HAMPARIAN et coll. (1958-155), EPSTEIN (1958-96), SCHWERDT et coll. (1956-305) ; par dialyse contre la polyvinyle pyrrolidone (méthode essayée par PRIER et coll., 1958-274), ou par le polyéthylène-glycol selon la technique proposée par ALBANO (1961-2), PHILIPSON et coll. (1960-269). Cependant il apparaît très difficile d'apprécier la pureté d'une suspension virale, car les risques de contamination d'une fraction à l'autre sont grands. Selon EPSTEIN et coll. (1958-98), il semble que le seul critère valable soit le contrôle par la microscopie électronique.

CHAPITRE III

RESULTATS ACQUIS PAR D'AUTRES METHODES

Avant de clore cette troisième partie, il nous paraît légitime de faire une place aux résultats acquis par d'autres auteurs grâce à des méthodes qu'il ne nous a pas été possible d'employer. Nous verrons ainsi que les résultats, que nous venons d'exposer dans le domaine morphologique, cytochimique et dynamique, se trouvent confirmés et étayés par des travaux importants de microscopie électronique et d'immunofluorescence.

I. — MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

L'utilisation du microscope électronique devait permettre d'étudier la relation existant entre virus et constituants cellulaires.

A. — CORRELATION ENTRE LES OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ORDINAIRE ET AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

MORGAN et coll. (1958 - 237) montrent dans quelle mesure il est possible de comparer les résultats obtenus par examen de coupes ultrafines et ceux obtenus par examen des cellules au microscope ordinaire.

La meilleure corrélation est obtenue en étudiant d'une part une coupe épaisse au microscope ordinaire et d'autre part une coupe ultrafine au microscope électronique. Il est plus facile d'étudier les modifications cellulaires par des méthodes cytochimiques d'abord et de les repérer ensuite au microscope électronique.

Cependant la microscopie électronique fournit peu de renseignement sur la composition chimique des structures rencontrées au cours de l'infection. Les détails cherchés au microscope électronique sont très fins. Une très petite partie de la cellule (1/500 seulement selon ROSE et coll., 1960 - 287) est observée. Il faut s'entourer de nombreuses précautions car peu de cellules sont infectées. Il est difficile de faire correspondre structure et fonction physiologique.

Les premières études de KJELLEN (1955 - 191), LAGERMALM et coll. (1957 - 202), MORGAN et coll. (1957 - 238) ont montré la présence de particules virales au sein de la masse centrale qui se constitue au cours de l'infection. Il a même été possible de suivre l'apparition et l'évolution des lésions cellulaires.

Les différents travaux de microscopie électronique sur les cellules infectées par des adénovirus conduisent également à la notion d'une évolution de type cyclique.

HARFORD et coll. (1956 - 158) rapportent les différents stades correspondant à l'infection de cellules HeLa par l'adénovirus type 4, et LAGERMALM et coll. (1957 - 202) avec l'adénovirus type 5.

Les premières altérations spécifiques sont visibles 24 heures après l'infection : des zones grises apparaissent au contact de la membrane nucléaire. Les particules virales se voient dans les noyaux présentant des zones grises. Les nucléoles peuvent être en contact avec les particules virales. Les altérations nucléaires typiques se rencontrent 48 heures après l'infection. La membrane nucléaire apparaît gonflée. Dans quelques cas, la cellule éclate et répand ses constituants. On peut voir alors des particules virales dans le cytoplasme. Certaines cellules restent encore apparemment normales.

GODMAN et coll. (1960 - 143), faisant une étude détaillée des cellules HeLa ou Hep2 infectées par l'adénovirus type 5 décrivent plusieurs stades :

Au début de l'infection, on observe quelques modifications intranucléaires. Cependant on ne peut pas encore identifier de particules virales dans le noyau. On voit apparaître des zones denses et grises.

Puis le matériel nucléaire apparaît irrégulièrement réparti. On reconnaît des cristaux de protéines non virales. Il se constitue une « matrice » contenant fibrilles et granules. Les nucléoles, partiellement visibles, sont granuleux. Les particules virales se rencontrent essentiellement à la surface du réticulum dense.

A ce moment, on observe une masse centrale dans la zone dense du noyau. Elle contient des cristaux de virus entourés de substance nucléaire. A la périphérie de la masse centrale, on trouve des particules virales, un ou des cristaux hexagonaux et plusieurs corps denses dont certains correspondent aux débris nucléolaires.

Enfin la membrane nucléaire peut se rompre et se replier sur elle-même. On trouve alors des particules virales et des constituants nucléaires répartis dans le cytoplasme.

Des résultats analogues sont obtenus par ATANASIU et coll. (1960 - 10), SHARPLESS et coll. (1961 - 307) avec le virus GAL de la poule.

Si les modifications nucléaires observées sont importantes, les modifications cytoplasmiques sont peu nombreuses. HARFORD et coll. (1956 - 158) ne signalent pas de lésions cytoplasmiques au début de l'infection.

LAGERMALM et coll. (1957 - 202) décrivent une vacuolisation cytoplasmique et une diminution de la définition des structures cytoplasmiques 48 heures après l'infection. Il semble que le cytoplasme contienne des particules virales lorsque la membrane nucléaire est rompue et que le virus se trouve libéré.

Ces lésions nucléaires obtenues sont spécifiques des adénovirus. En effet, les cellules non infectées ne présentent pas d'altérations de ce type. Le noyau d'une cellule non infectée contient un matériel granuleux et réticulé et des nucléoles caractéristiques et denses. La membrane nucléaire est mince et double. De plus, des cellules infectées par un autre virus, tel que le virus poliomyélitique, ne montrent pas de particules virales du type rencontré pour les adénovirus.

B. — LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ET LES PROBLEMES DES FORMATIONS PARTICULIERES

Deux sortes de formations particulières se rencontrent au cours de l'infection des cellules par adénovirus : les masses cristallines présentant l'aspect de barre quadrangulaire avec l'adénovirus type 5 et les membranes à feuillet multiples au voisinage des particules virales.

1) Etude des cristaux.

Les coupes ultrafines de cellules HeLa infectées par les adénovirus types 3, 4, 5 ou 7 peuvent contenir des agrégats cristallins intranucléaires, à côté des particules virales. Ils sont à rapprocher des masses cristallines visibles sur des cellules « in vivo » ou après coloration. Ce sont les travaux de MORGAN et coll. (1956 - 236), BLOCH et coll. (1957 - 33), MORGAN et coll. (1957 - 238), ROSE et coll. (1958 - 286). Avec l'adénovirus type 5, ces cristaux prennent un aspect de barres apparaissant d'abord dans le noyau. On peut les rencontrer quelquefois dans le cytoplasme. Ils apparaissent souvent avec une section hexagonale dans les coupes ultrafines de cellules infectées. Ils sont de nature protéique.

MORGAN et coll. (1960 - 241) observent soit des cristaux dont les limites sont diffuses, soit des cristaux dont les limites sont nettes. Il arrive que le noyau contienne plusieurs petits cristaux pris dans un matériel réticulé très dense.

Toutes les souches d'adénovirus type 5 ne provoquent pas la formation de cristaux, la souche AD75 est l'une de celles qui en donnent régulièrement.

Au début de l'infection, les limites des cristaux sont diffuses, puis elles deviennent de plus en plus nettes. Cela suggère qu'au cours du processus de cristallisation, de nombreuses molécules se déplacent lentement pour prendre une orientation dans un arrangement cristallin. La zone de transition est la périphérie du cristal. Il n'est pas rare de voir des sections de cristaux qui montrent des lignes bien nettes sur les côtés et les extrémités diffuses.

Il y aurait, autour du cristal, une zone où les protéines sont très concentrées. Les molécules de protéines prendraient leur orientation en repoussant les particules virales. Au moment de la rupture de la membrane nucléaire et de la libération du virus, les cristaux disparaissent, les limites deviennent diffuses et les cristaux ne se distinguent plus.

2) Etude des membranes à feuillet multiples.

MORGAN et coll. (1957 - 239) ont remarqué la formation de feuillet anormaux dans certains noyaux de cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 3. Les auteurs ont pu montrer que bien des types d'adénovirus provoquent la formation de ces feuillet anormaux. Il est possible d'en observer la présence dans certains noyaux de cellules infectées par les types 1 à 8. GREGG et coll. (1959 - 153) observent ces formations dans des noyaux de cellules infectées par l'adénovirus type 10.

Ces membranes peuvent se disposer de plusieurs façons. Elles peuvent constituer des canaux intranucléaires dont les parois sont formées de plusieurs lamelles parallèles. Il arrive que ces lamelles soient concentriques. Ces deux aspects semblent caractéristiques de l'adénovirus type 3 (MORGAN et coll., 1956 - 236). Généralement les membranes sont constituées de feuilletts parallèles et se disposent en amas sans ordre apparent. Ces structures représentent une manifestation inhabituelle de l'aptitude des noyaux à former des membranes.

Des formations analogues ont été décrites dans d'autres cellules telles que les œufs d'Otala, de Spinula et dans les cellules pancréatiques d'un amphibien, l'Amblystoma, et les spermatides de rat par SWIFT (1956 - 319). L'auteur pense qu'elles auraient un rôle dans le transfert spécifique de matériel du noyau dans le cytoplasme. Ces structures ont également été observées dans des cellules HeLa ou des cellules amniotiques infectées par le virus de l'herpès.

Les particules d'adénovirus apparaissent à l'intérieur des tubules formés, elles ne sont jamais localisées entre les feuilletts parallèles. Selon GREGG et coll. (1959 - 153) ces structures représentent une réponse à l'infection car elles se forment en même temps qu'apparaissent les particules virales. Il semble que la membrane de la particule virale se forme à partir du feuillet externe des lamelles. Il semble même que la présence de ces membranes très près des particules virales leur permette de s'approcher de la surface du noyau et de passer dans le cytoplasme sans rompre la continuité nucléaire. Lorsque le virus est localisé dans le cytoplasme, il se trouve dans les vacuoles, les membranes desquelles semblent bien être d'origine nucléaire.

On ne connaît pas la relation qui existe entre les membranes nucléaires et cytoplasmiques et la multiplication du virus dans les cellules.

C. — LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE, MOYEN DIRECT D'ESTIMATION DE LA MULTIPLICATION DU VIRUS

Les différentes études de microscopie électronique tendent à prouver la localisation des particules virales dans certaines zones du noyau. On peut penser que le pouvoir infectieux des adénovirus serait associé aux particules virales décelables au microscope électronique, par analogie avec le virus de la vaccine et le virus du sarcome de Rous (EPSTEIN et coll., 1958 - 98).

De plus, certains auteurs ont étudié parallèlement l'apparition et l'évolution du pouvoir infectieux et les modifications cytologiques observées au microscope électronique. LAGERMALM et coll. (1957 - 202) ont montré que les particules virales sont décelables beaucoup plus tôt au microscope électronique.

La notion de rendement en particules virales paraît extrêmement faible. En effet, seuls quelques noyaux présentent des signes d'infection 24 heures après l'introduction du virus au contact des cellules. A un faible grossissement, toutes les cellules paraissent altérées. HARFORD et coll. (1956 - 158) pensent que ce phénomène pourrait s'expliquer soit par un effet « toxique », soit

par la propriété d'agglutination des cellules lorsqu'elles se trouvent en présence de virus comme le virus vaccinal (SCHERER, 1952 - 300).

Il semble donc qu'il n'y aurait pas de relation entre les altérations cellulaires observées et la multiplication virale, contrairement à ce qui a été décrit pour d'autres virus tels que le virus de la grippe (HENLE et coll., 1955 - 163) ou de la poliomyélite (ACKERMAN et coll., 1954 - 1).

D. — RENSEIGNEMENTS FOURNIS PAR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE SUR LA STRUCTURE DE LA PARTICULE VIRALE

L'étude des particules d'adénovirus a pu être conduite sur des suspensions virales purifiées ou sur des coupes ultrafines de cellules infectées.

1) Etude des suspensions virales purifiées.

Les études de HILLEMANN et coll. (1955 - 167), de TOUSIMIS et coll. (1957 - 325) par la méthode des ombrages sur des suspensions virales d'adénovirus type 4, purifiées par le fluorocarbène, permettent de mettre en évidence des particules virales dont la taille est de 70 à 90 m μ . Ces particules apparaissent sphériques ou polyédriques selon le mode d'observation au microscope électronique : virus séché à l'air, virus desséché après congélation ou coupes ultrafines de culots de suspensions virales. La particule virale apparaît limitée par une membrane de 4 m μ et contient un corps central de 30 m μ . VALENTINE et coll. (1957 - 327), utilisant l'acide phosphotungstique comme fixateur, suggèrent que la particule d'adénovirus ait une forme polyédrique (icosaèdre ou dodécaèdre). HORNE et coll. (1959 - 170) reprennent l'étude d'une suspension d'adénovirus type 5 après fixation par l'acide phosphotungstique selon la technique de BRENNER et coll. (1959 - 41). Les particules virales s'arrangent selon un motif hexagonal, chaque facette a 42 m μ . Dans le motif on reconnaît la symétrie 5, 3, 2. La forme de la particule virale est un icosaèdre comprenant 252 capsomères. Cet arrangement se retrouve dans le virus de l'herpès et de la polyédrine.

Avec l'adénovirus type 5, purifié au fluorocarbène par la technique de GESSLER et coll. (1956 - 133), PEREIRA et coll. (1958 - 263) observent des particules de 70 m μ . EPSTEIN et coll. (1960 - 100), en utilisant le permanganate de potassium comme fixateur, voient des particules de 60 m μ . Les particules ont une forme hexagonale comme l'ont montré BRENNER et coll. (1959 - 41). La présence de la membrane est plus douteuse et on peut se demander si elle ne correspond pas à une contamination qui aurait lieu au cours de l'extraction.

SHARPLESS et coll. (1961 - 307), DAVIES et coll. (1961 - 63), MACPHERSON et coll. (1961 - 227), utilisant la technique de BRENNER et coll. (1959 - 41), observent le même arrangement, selon un icosaèdre, des particules du virus GAL de la poule. C'est un argument supplémentaire pour le placer dans le groupe des adénovirus.

EPSTEIN et coll. (1960 - 99 ; 1961 - 102) traitent des suspensions

virales par les nucléases avant fixation au permanganate de potassium. Si les particules sont traitées par la ribonucléase, ils n'observent pas de modifications. Par contre si les particules virales sont traitées par la désoxyribonucléase en milieu alcalin, les nucléoïdes sont digérés. Cette expérience montre bien que la particule d'adénovirus contient essentiellement du DNA localisé au niveau du nucléoïde de la particule virale.

2) Etude des coupes ultrafines de cellules infectées.

KJELLEN et coll. (1955-191) trouvent dans des noyaux de cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 5 des particules allongées dont les dimensions sont $50 \text{ m}_\mu \times 30 \text{ m}_\mu$ approximativement et pouvant présenter un arrangement cristallin.

Low et coll. (1956-224) étudient les modifications de la morphologie de la particule virale selon la distorsion subie par la coupe. Il est difficile d'étudier l'arrangement des particules virales. De plus elles n'apparaissent pas tout à fait sphériques : $62,5 \text{ m}_\mu \pm 2,5 \text{ m}_\mu$.

MORGAN et coll. (1956-236) observent des particules virales de 60 m_μ de diamètre. Les centres sont espacés de 65 m_μ . Certaines particules ont un corps central de 24 m_μ de diamètre. Elles présentent un arrangement cubique.

MORGAN et coll., (1956-237) étudient les difficultés d'interprétation des structures observées dans les coupes ultrafines de cellules. Ils montrent le rôle du fixateur utilisé (formol neutre ou acide osmique), le rôle des couteaux placés sur le microtome pouvant intervenir dans des variations de pression, de distorsion, d'élongation, aboutissant à des modifications dans les structures observées. Il peut aussi y avoir contamination des différentes surfaces.

HARFORD et coll. (1956-158) observent dans quelques noyaux de cellules infectées des particules présentant des arrangements spéciaux. Ces particules sont petites, toutes de même taille, rondes ou ovoïdes. Certaines présentent un corps central et une membrane. Il arrive que ces particules présentent un arrangement cristallin avec les types 3 et 4. Les cellules non altérées ne donnent pas ces images cristallines. La taille des particules de virus ainsi mises en évidence est de 67 m_μ pour le type 4 et 63 m_μ pour le type 3.

BARSKI et coll. (1958-22) observent avec les types 1 et 4 une distorsion et une lobulation du noyau. De nombreuses vacuoles contiennent les particules virales. Certaines particules virales présentent un arrangement cristallin.

MORGAN et coll. (1960-241) essaient les différentes méthodes proposées pour la conservation du virus intranucléaire. C'est ainsi que la fixation au permanganate de potassium MnO_4K paraît la plus satisfaisante : les centres des particules virales sont espacés de 65 m_μ , les membranes des particules virales sont visibles ainsi que les membranes périphériques. Le corps central de la particule virale semble uniformément dense. Cependant il est impossible de mettre en évidence les sous-unités de HORNE et coll. (1959-170)

qui s'organisent en un icosaèdre. Peut-être est-ce dû à une mauvaise préservation où un contraste mal mis en évidence.

3) Intérêt de la recherche de la structure des particules virales au microscope électronique.

Il est intéressant de constater que des virus connus comme provoquant des tumeurs chez l'homme tels que *Molluscum contagiosum*, le virus de la verrue vulgaire, le virus du kérato-acanthome, ou chez l'animal tel que le virus du sarcome de Rous et surtout du polyome de la souris, présentent une structure capsomérienne comparable à celle de l'adénovirus.

Si l'on ajoute que le virus simien SV40, capable de provoquer des sarcomes chez le hamster et de modifier le karyotype de cellules normales *in vitro*, présente encore les mêmes caractères ultrastructuraux, on s'aperçoit qu'il n'y a rien d'étonnant à ce que certains types d'adénovirus se soient récemment révélés cancérogènes (TRENTIN, 1962 - 326).

L'importance de cette relation possible entre structure capsomérienne et pouvoir oncogénique est facile à concevoir sur le plan de pathologie générale. Sur le plan cytologique, elle conduit à supposer que l'adénovirus risque d'avoir des rapports très étroits avec les constituants chromosomiaux.

Une telle conception souligne l'intérêt que pourraient présenter des recherches sur les rapports entre adénovirus et mitoses et plus généralement entre adénovirus et chromosomes.

Au cours des différents travaux sur les modifications cellulaires provoquées par les adénovirus, les auteurs notent toujours une inhibition de la mitose. PEREIRA (1959 - 259) considère ce blocage des mitoses comme caractéristique.

BOYER et coll. (1957 - 37) infectant des cellules HeLa par les adénovirus types 1 et 2 observent une diminution de 50 p. 100 des mitoses, 18 heures après l'introduction du virus.

PEREIRA (1958 - 257), PEREIRA et coll. (1959 - 264), signalent un blocage des mitoses en 48 heures lorsque des cellules HeLa sont infectées par l'adénovirus type 5. Le taux de mitoses s'abaisse à 44 p. 100 après 12 heures d'infection, 9 p. 100 après 24 heures et à 2 p. 100 après 32 heures.

GODMAN et coll. (1960 - 143) observent une diminution du taux de mitoses lorsque les cellules HeLa ou Hep2 sont infectées par l'adénovirus type 5. GREEN et coll. (1961 - 151) décrivent le même phénomène avec l'adénovirus type 2.

HARFORD et coll. (1956 - 158) signalent également une diminution du nombre de mitoses des cellules HeLa infectées par l'adénovirus type 4 en faisant leurs études au microscope électronique.

Seuls, BALDUZZI et coll. (1960 - 14) n'observent pas de différences dans le taux de mitoses de cellules KB non infectées ou infectées par l'adénovirus type 4.

La blocage des mitoses par l'infection virale est un phénomène

général qui a été observé avec le virus de l'herpès par ROIZMAN (1961 - 283), le virus de la rougeole par ROIZMAN et coll. (1961 - 284 ; 1962 - 285), le virus de l'hépatite du chien par FASTIER (1960 - 107).

Il en ressort qu'une nouvelle ligne de recherche pourrait être l'étude de la morphologie chromosomiale au cours d'infection ménagée ou inapparente de la cellule.

E. — RESUME

Si la constitution des particules virales apparaît variable selon les auteurs, les méthodes expérimentales peuvent sans doute en être la cause. Il semble établi que les particules virales ont un corps central et une membrane.

Les particules virales ont été trouvées dans le noyau à l'endroit même où s'installent les lésions typiques. Il est possible qu'il en existe une partie dans le cytoplasme qui échappe à la détection. Il semble cependant que le noyau de la cellule donnerait « l'environnement biochimique nécessaire à la multiplication du virus » (HARFORD et coll., 1956 - 158).

Il a été possible d'établir une suite de modifications nucléaires faisant penser à une évolution de type cyclique.

De 6 à 18 heures après l'infection, les cellules ont une structure apparemment inchangée.

Les premières lésions nucléaires apparaissent 24 heures après l'infection : on reconnaît des zones grises et denses. Puis se constitue la masse centrale contenant des particules virales arrangées en agrégats cristallins. A la périphérie de la masse centrale, on trouve soit des particules virales, soit des masses cristallines hexagonales, et des corps arrondis ou ovoïdes plus ou moins denses. Les nucléoles peuvent apparaître granuleux dans certains cas.

Enfin la membrane nucléaire peut se rompre et les particules virales et les constituants nucléaires se répartissent dans le cytoplasme.

Les études de microscopie électronique ont permis d'apporter des renseignements fondamentaux sur la structure de la particule virale et tendent à prouver le pouvoir cancérigène de certains types d'adénovirus.

II. — L'IMMUNOFLUORESCENCE.

Les chercheurs utilisant l'immunofluorescence, s'inspirent de la technique de WELLER et COONS (1954 - 336).

PEREIRA et coll. (1959 - 264) mettent en évidence une succession de modifications cellulaires sur cellules HeLa infectées par les adénovirus type 5.

— Les cellules non infectées montrent une faible fluorescence avec une masse sombre pour le noyau.

— Quatre à 8 heures après l'infection, les cellules ne présentent pas de modifications.

-- Douze heures après l'infection, on observe les modifications caractéristiques dans les noyaux : 6 à 10 granules fluorescents par noyau en forme de rosette.

— De 16 à 20 heures, le nombre des granules ou des anneaux fluorescents augmente dans le noyau. A ce moment apparaît une fluorescence cytoplasmique.

— Vingt-quatre heures après l'infection, on observe une fluorescence cytoplasmique dans la moitié des cellules. Le noyau devient très brillant et subit une distorsion. Les nucléoles semblent disparaître dans la plupart des noyaux ayant subi une distorsion.

Avec l'adénovirus type 4, BOYER et coll. (1959 - 38) observent au *stade 1* : 14 heures à 24 heures après l'infection, les modifications caractéristiques, des granules fins répartis dans le noyau.

Au *stade 2* : 30 à 38 heures après l'infection, on trouve des petits cristaux entre les granules. La membrane nucléaire n'est pas colorée.

Au *stade 3* : 48 à 72 heures après l'infection, les cellules ont une coloration diffuse, non spécifique. Il est difficile de localiser la production d'éléments viraux.

Ces expériences d'immunofluorescence permettent d'apporter des informations sur le pourcentage de cellules produisant du virus et la localisation du matériel viral produit. La nature du matériel révélé est encore mal connue, il reste à établir s'il est spécifique de groupe ou de type. Il ne semble pas y avoir de synchronisation de la synthèse du virus dans les différentes cellules. Ce phénomène est peut-être dû à des interactions virus-cellules-hôtes.

Les expériences d'immunofluorescence et de détection du pouvoir infectieux tendent à rapprocher les deux phénomènes. Ils sont en effet liés aux lésions cellulaires spécifiques reconnues au microscope à fort grossissement après coloration, ou au microscope à contraste de phase.

Il n'existe pas de relation entre le pouvoir infectieux et la fluorescence cytoplasmique.

En résumé :

Les techniques d'immunofluorescence selon WELLER et COONS (1954 - 336) ont permis d'apporter des informations sur le comportement des cellules soumises à l'agression d'un adénovirus.

Au début de l'infection (10 à 20 heures) des granules fluorescents apparaissent dans les noyaux. Ces granules deviennent de plus en plus nombreux, l'ensemble du noyau est très brillant. Il apparaît une fluorescence cytoplasmique, les nucléoles ont tendance à devenir diffus. Quarante-huit à 72 heures après l'infection, les cellules s'agglutinent et la fluorescence est diffuse.

Un petit nombre de cellules seulement présentent des lésions et produisent du virus. Il n'y a pas de relation entre pouvoir infectieux et matériel cytoplasmique fluorescent.

CONCLUSIONS

En prenant comme sujet d'expérience des cellules cultivées *in vitro* et comme agresseur certains adénovirus, il est possible de faire apparaître une série de modifications biologiques des cellules qui sont directement en rapport avec la pénétration dans leur noyau, d'acide désoxyribonucléique étranger.

I

Essai d'appréciation du comportement de l'agresseur viral dans la cellule

Nous avons apprécié le comportement de cet agresseur essentiellement :

- par l'étude des remaniements des acides nucléiques et des protéines cellulaires intervenant au cours de son développement ;
- par l'importance de son effet destructeur global sur les cellules ;
- par le titrage d'un facteur soluble qui accompagne son développement intracellulaire.

L'étude des *modifications des acides ribonucléiques, désoxyribonucléiques et des protéines*, au cours du développement intracellulaire de l'adénovirus type 5, montre une augmentation significative de chacun de ces produits dans le sens : acides ribonucléiques puis protéines en même temps que les acides désoxyribonucléiques.

On peut penser en effet, en se basant sur nos résultats acquis et sur ceux obtenus par microscopie électronique, que l'augmentation d'acides désoxyribonucléiques correspond à la synthèse du virus au sein de la cellule-hôte.

L'effet global a été apprécié sur diverses cellules. Les cellules HeLa sont apparues les plus sensibles. Tous les types d'adénovirus sont capables de provoquer des lésions cellulaires dans des délais plus ou moins longs. L'estimation quantitative de ces effets destructeurs (ou titrage du pouvoir infectieux) révèle une bonne reproductibilité du phénomène. Toutefois les modalités d'observation dans le temps jouent un rôle notable puisque les résultats montrent une élévation constante mais irrégulière de la courbe de 2 à 14 jours.

Les courbes traduisant la production de matériel infectant par l'adénovirus type 1, présentent deux allures différentes : ou bien la courbe comporte 2 sommets (56 à 96 heures et 168 à 200

heures) séparés par un minimum pouvant être plus ou moins important ; ou bien la courbe s'élève progressivement jusqu'à un plateau atteint autour de 96 heures. Lorsque le titrage est effectué à partir d'un liquide contenant la fraction virale extracellulaire libérée chaque jour, le titre est faible et les particules infectantes apparaissent plus tardivement, vers le 5^e ou 6^e jour au lieu de 24 à 48 heures.

Avec l'adénovirus type 5, la production de particules virales infectantes, est décelable dans les cellules dès 24 heures après l'infection. Soixante-douze heures après l'infection le titre est élevé.

Les méthodes d'estimation du *matériel soluble* antigénique spécifique permettent de retrouver des résultats analogues.

La fraction soluble apparaît comme un produit d'excrétion de la cellule que celle-ci libère difficilement. Des méthodes énergiques et brutales sont nécessaires pour cette libération.

Les cellules soumises à l'agression d'un adénovirus (types 1 à 16 dans nos expériences) réagissent en produisant du matériel soluble en même temps que des particules virales capables de se développer dans d'autres cellules.

Nous savons que la quantité de virus introduite peut faire varier considérablement la production de particules infectantes ou de matériel soluble. Deux sortes de modifications morphologiques des cellules sont visibles : celles qui surviennent très rapidement après l'infection rappelant un effet « toxique » et celles qui surviennent tardivement et qui sont liées à la multiplication du virus.

L'apparition et l'évolution du matériel infectant et du matériel soluble apparaissent comme des phénomènes différents : les courbes ne sont pas superposables. Cependant ils sont liés car les courbes ont la même allure. Le matériel soluble est décelable après que des modifications cellulaires aient été observées au faible grossissement.

Ces 2 phénomènes traduisent une évolution de type cyclique rappelant celle rencontrée pour d'autres virus.

Les résultats qui viennent d'être énoncés ont permis d'établir une donnée précise sur le comportement de l'agresseur, comportement qui explique les réactions de la cellule.

II

Les réponses de la cellule

Les réactions proprement dites de la cellule à l'agression virale ont été étudiées par des méthodes statiques et des méthodes dynamiques.

Les *méthodes statiques* nous ont permis de mettre en évidence les modifications morphologiques des cellules au cours de l'infection, les remaniements des acides nucléiques, des protéines et de l'activité phosphatasique acide.

Les *modifications morphologiques* des cellules vont de l'inclu-

sion éosinophile rencontrée au sein du noyau à la masse centrale basophile séparée de la membrane nucléaire par un espace clair découpé en logettes. Avec les adénovirus type 5, ces logettes sont fréquemment occupées par des formations cristallines ayant l'allure d'une barre. Le cytoplasme est réduit. Les nucléoles sont repoussés à la périphérie de la masse centrale.

Les *remaniements des acides nucléiques*, au sein de la cellule, sont importants. Nous observons une augmentation de la pyroninophilie traduisant une augmentation d'acides ribonucléiques cytoplasmiques et nucléaires au début de l'infection. Il se constitue un réseau rouge enserrant les nucléoles et c'est à ce niveau que se forme la masse centrale FEULGEN positive, réaction indicatrice de l'accumulation d'acides désoxyribonucléiques. La masse centrale est séparée de la membrane nucléaire par un espace clair pouvant contenir les formations cristallines de nature protéique.

Les préparations examinées au contraste de phase montrent des modifications importantes du nucléole au cours de l'infection virale. Il présente soit un aspect troué soit une densification. Il peut disparaître à la fin du cycle d'infection.

L'étude des *variations d'activité phosphatasique acide*, montre le rôle de certains constituants cytoplasmiques au cours de l'agression virale (lysosomes ?).

La *méthode dynamique* utilisant l'enregistrement microcinématographique a permis de retrouver les différents stades morphologiques et de préciser le rôle du cytoplasme au cours de l'infection virale. Les masses cristallines apparaissant à la fin du cycle sont instables. Il a été possible d'étudier plus spécialement l'effet « toxique » des suspensions virales utilisées, produisant des lésions précoces, non spécifiques, localisées dans la zone golgienne.

III

L'ensemble de nos travaux sur l'adénovirus type 5 infectant des cellules peut se résumer dans le tableau 37.

Ce tableau suggère un métabolisme intracellulaire du virus. Ce métabolisme pourrait se diviser en 3 phases.

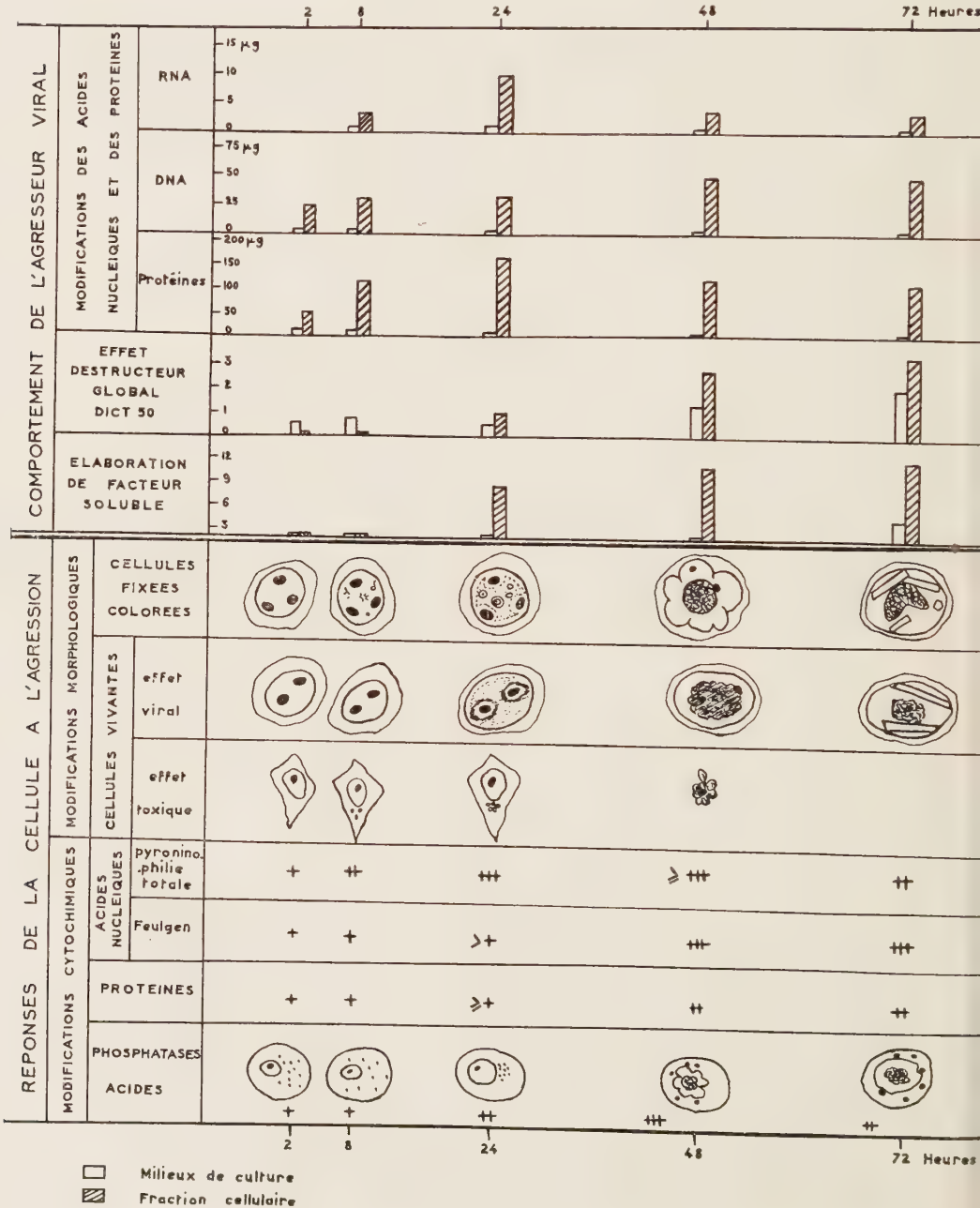
Première phase : incorporation du virus à la cellule entre zéro et 18 heures environ (voir schéma 1).

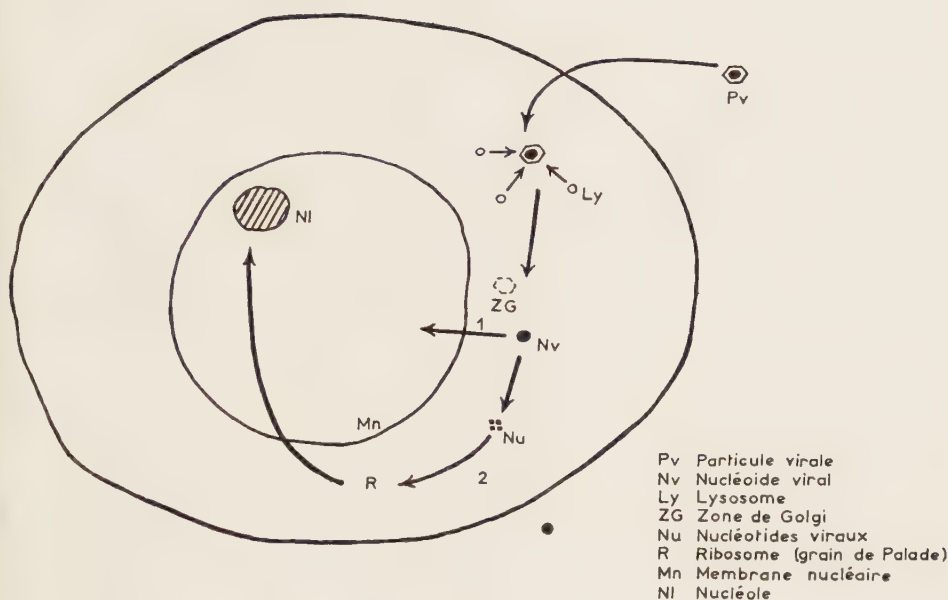
La particule virale, de forme hexagonale, comprenant 252 capsomères, telle qu'elle apparaît au microscope électronique, est introduite dans le milieu ambiant de la cellule. Cette particule pénètre à l'intérieur de la cellule, probablement selon un processus de micropinocytose. Les perturbations cytoplasmiques qu'elle provoque sont les suivantes : augmentation d'acides ribonucléiques, redistribution des lieux d'activité phosphatasique acide, individualisation d'une zone golgienne hypertrophiée.

Ces modifications pourraient résulter de la prise en charge des particules virales par les lysosomes. Ceux-ci, révélés par leur activité phosphatasique acide, auraient en effet dégradé la particule virale en sous-unités protéiques d'une part et nucléiques d'autre

TABEAU 37

Synthèse des résultats obtenus concernant l'agresseur viral et la réponse de la cellule à son agression par l'adénovirus type 5.





SCHEMA 1

Incorporation du virus dans la cellule-hôte

part. Les éléments protéiques seraient stockés dans la zone golgienne et les éléments nucléiques seraient incorporés dans le métabolisme des acides nucléiques de la cellule. Cette incorporation pourrait se produire selon deux modes :

Premier mode : l'acide désoxyribonucléique viral pourrait pénétrer directement dans le noyau par un processus encore mal connu, faisant intervenir les propriétés particulières de la membrane nucléaire, permettant le transit de certaines grosses molécules.

Deuxième mode : l'acide désoxyribonucléique viral pourrait parvenir à l'intérieur du noyau par un trajet plus long. La molécule serait scindée, les nucléotides seraient incorporés au niveau des ribosomes qui représentent le stock d'acides nucléiques cytoplasmiques.

Ces deux modes représenteraient un cycle court et un cycle long d'incorporation des acides nucléiques.

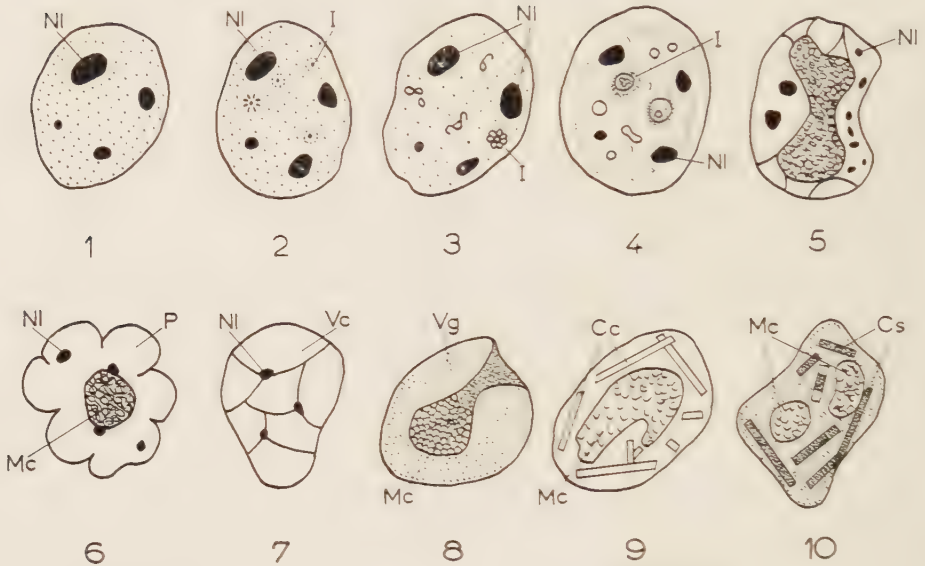
Au cours de cette période, le virus serait donc détruit pour permettre à l'acide nucléique de transmettre son « modèle » au noyau.

Deuxième phase : développement des inclusions virales 24 à 48 heures après pénétration des molécules de DNA viral ou de nucléotides viraux, les lésions nucléaires décrites se manifestent (voir schéma 2).

Stade 1 : le noyau est apparemment normal.

NI Nucléole
I Inclusions primaires
P Pétales
Mc Masse centrale

Vc Vacuoles claires
Vg Vacuoles grises
Cc Cristal clair
Cs Cristal sombre



- | | |
|---|---------------------------|
| 1 Noyau normal | 6 Pétalisation |
| 2 Apparition d'inclusions primaires | 7 Vacuolisation claire |
| 3 Organisation des inclusions primaires | 8 Vacuolisation grise |
| 4 Inclusions et réseau basophile | 9 Cristallisation claire |
| 5 Condensation du réseau | 10 Cristallisation sombre |

SCHEMA 2

Multiplication du virus dans le noyau.

Stade 2 : apparition d'inclusions punctiformes éosinophiles. Certaines peuvent se disposer en rosette.

Stade 3 : les inclusions sont plus grosses et peuvent prendre des formes variables : filament, grappe.

Stade 4 : apparition d'un réseau enserrant les nucléoles, les inclusions prennent l'aspect de disques ou d'anneaux.

Aux stades 2, 3, 4, la microscopie électronique montre des particules virales dispersées.

Stades 5 à 8 : à l'emplacement du réseau, il apparaît une densification centrale présentant un aspect de nids d'abeille qui se rétracte progressivement. Cette masse centrale peut rester en relation avec la membrane nucléaire par des filaments rappelant des « cordages ». Les nucléoles peuvent disparaître. Dans certaines cellules les débris nucléolaires se retrouvent dans l'espace clair entre la masse centrale et la membrane nucléaire.

Au microscope électronique, la masse centrale apparaît bourrée de particules virales.

Stades 9 et 10 : on voit apparaître des formations cristallines

de nature protéique dans la zone comprise entre la masse centrale et la membrane nucléaire. Ces cristaux d'une longueur de $30\ \mu$, sont visibles au microscope ordinaire. Les cristaux peuvent apparaître tantôt clairs, tantôt sombres, selon qu'ils sont logés dans des espaces clairs ou des espaces sombres. Dans quelques cas, il a été possible de voir des cristaux panachés faisant penser à un enrobage du cristal de nature protéique par un matériel contenant de l'acide désoxyribonucléique.

Pendant cette seconde phase se développent les particules virales infectantes et le matériel soluble antigénique. Ce développement correspond sans doute à l'augmentation de protéines observée en même temps que l'augmentation de DNA. Des études détaillées sur la séparation et la purification des suspensions virales ont montré qu'il existe au moins trois protéines immunologiquement distinctes : une protéine responsable de la fixation du complément spécifique de groupe, une toxine spécifique de groupe et une protéine spécifique de type. Des recherches récentes ont montré que la synthèse des protéines décrites, suit la synthèse de DNA de 2 à 3 heures et précède l'apparition du virus infectant de 2 heures environ.

Troisième phase : libération du matériel viral dans le milieu après 72 heures (voir schéma 3).

Les particules virales hexagonales sont reconstituées, elles peuvent se présenter isolées ou selon un arrangement cristallin. Ces particules se rencontrent dans le noyau et dans le cytoplasme. La membrane nucléaire a été rompue par suite de la lyse cellulaire survenue après la mort de la cellule. Il est possible de reconnaître par microscopie électronique trois fractions A, B et C. La fraction A serait constituée de gros granules, la fraction B se présenterait sous forme filamenteuse et la fraction C sous forme de petits éléments punctiformes. Les cristaux décrits dans la deuxième phase peuvent se retrouver dans le cytoplasme.

Les cellules libèrent une partie du matériel viral synthétisé dans le milieu. Cependant ce matériel est peu abondant, il est retenu le plus souvent dans le noyau de la cellule.

La troisième phase étant achevée, le milieu dans lequel les cellules ont été cultivées contient au moins 4 types de particules :

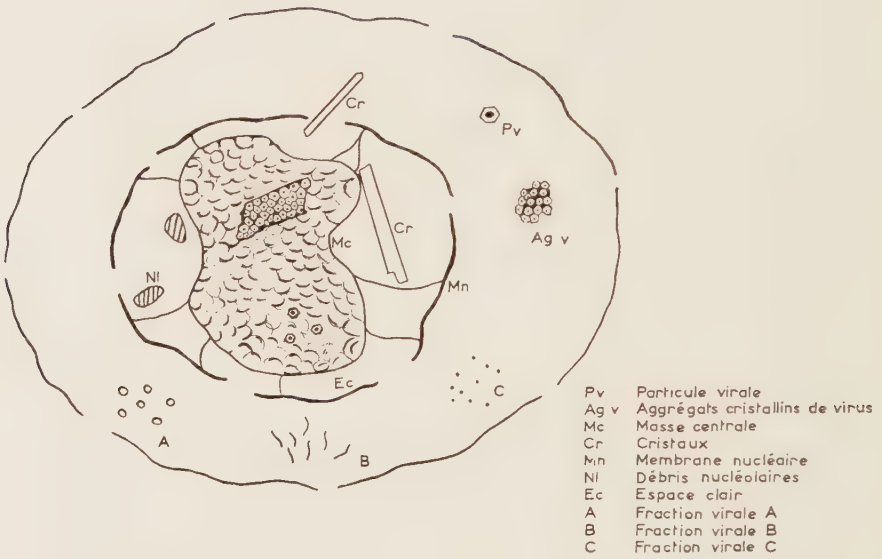
1. — les particules virales complètes qui seront susceptibles de reproduire une nouvelle série d'altérations cellulaires avec multiplication ;

2. — les particules solubles A qui sont spécifiques de groupe non infectantes ;

3. — les particules B non infectantes mais capables de provoquer la mort des cellules par effet « toxique », après altérations vacuolaires du cytoplasme et hypertrophie de la zone golgienne, observées précocement ;

4. — les particules C non infectantes, de nature protéique, pouvant intervenir dans le phénomène d'hémagglutination.

La particule virale entière est capable de provoquer dans une cellule non seulement sa propre multiplication, mais aussi les particules protéiques A, B et C, tandis qu'aucune des particules A, B et C ne peut provoquer l'apparition des particules entières. La présence d'acide nucléique dans la particule virale est donc bien l'élément reproductif et infectant.



SCHEMA 3

Libération du matériel viral par la cellule.

En conclusion, l'ensemble de ce travail démontre l'importance majeure de la pénétration d'acide désoxyribonucléique d'origine virale dans une cellule vivante.

La description des effets produits par la pénétration du virus dans la cellule se révèle complexe à la fois à cause de la multiplicité des mécanismes biochimiques perturbés au niveau de la cellule et à cause de l'hétérogénéité des suspensions virales.

De grands progrès pourraient être réalisés en utilisant des suspensions virales purifiées. Des résultats plus significatifs pourraient être obtenus par des méthodes biochimiques extractives appliquées à la fraction cellulaire de cultures infectées.

Nous avons cru devoir présenter cette étude en détail car avant d'arriver à la stricte application de méthodes biochimiques au problème de la relation cellules-virus, il était nécessaire de faire de nombreuses expérimentations empiriques. Notre effort a été de tenter de sortir de cet empirisme.

OUVRAGES GENERAUX

- Advance in Virus Research*, 1955 à 1961.
Annual Review of Biochemistry, 1952 à 1961.
Annual Review of Microbiology, 1952 à 1961.
Annual Review of Physiology, 1955 à 1961.
- BOURNE (G.-H.). — Cytology and Cell Physiology. *Oxford University Press*, New-York, 1952.
- BRACHET (J.). — Biochemical Cytology. *Acad. Press*, New-York, 1957.
- BRACHET (J.) et MIRSKY (A.-E.). — The Cell : Biochemistry, Physiology, Morphology :
 Vol. I : Methods : Problems of cell biology, 1959.
 Vol. II : Cells and their component parts, 1961.
 Vol. III : Meiosis and mitosis, 1961.
 Vol. IV : Specialized cells, part 1, 1960.
 Vol. V : Specialized cells, part 2, 1961.
Acad. Press, New-York.
- BUDDENBROCK (W. Van). — Vergleichende Physiologie.
 Band III : Nervenphysiologie, 1953.
 Band V : Physiologie der Erfolgsorgane, 1961.
Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart.
- BURNET (F.-M.) et STANLEY (W.-M.). — The Viruses : biochemical, biological and biophysical properties.
 Vol. I : General Virology, 1959.
 Vol. II : Plant and Bacterial viruses, 1959.
 Vol. III : Animal viruses, 1959.
Acad. Press, New-York.
- CHEVREMONT (M.). — Notion de cytologie et histologie. Edit. Desoer, Liège, 1956.
- COLOWICK (S.-P.) et KAPLAN (N.-O.). — Methods in Enzymology.
 Vol. I : Preparation and assay of enzymes, 1955.
 Vol. II : Preparation and assay of enzymes, 1955.
 Vol. III : Preparation and assay of substrates, 1957.
 Vol. IV : Special techniques for the enzymologist, 1957.
Acad. Press, New-York.
- X^e Congrès International de Biologie Cellulaire : Paris, 1960. *Path. Biol.*, 1961, (9), 444-1004.
- DAVIDSON (J.-N.). — La biochimie des acides nucléiques. Dunod, Paris, 1960 (traduction de VENDRELY R.).
- Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases. 2nd Edit. Publication Office American Public Health Assoc. New-York, 1956.
- EMMENS (C.-W.). — Principles of biological assay. Chapman and Hall, 1948.
- GIESE (A.-C.). — Cell Physiology. Saunders C^o, Philadelphie and London, 1957.
- LAMOTTE (M.). — Initiation aux méthodes statistiques en biologie. Masson et C^{ie}, Edit., Paris, 1957.
- LÉPINE (P.) et SOHIER (R.). — Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus. Masson et C^{ie}, Edit., Paris, 1954.
- LISON (L.). — Statistique appliquée à la biologie expérimentale. Gauthiers Villars, Edit., Paris, 1958.

- MELLORS (R.-C.), — Analytical Cytology. 2nd Edit. Mc Graw Hill Book C^o Inc., 1959.
- PAUL (J.). — Cell and tissue culture. Edinburg and London E.S. Livingston, 1959.
- PEARSE (A.-G.-E.). — Histochemistry theoretical and applied. Little, Brown C^o Edit., Boston, 1960.
- POLICARD (A.) et BAUD (C.-A.). — Les structures inframicroscopiques normales et pathologiques des cellules et des tissus. Masson et C^{ie}, Edit., Paris, 1958.
- PROSSER (C.-L.), BROWN (F.-A.), BISHOP (B.-W.), JAHN (T.-L.) et WULFF (N.-J.). — Comparative animal physiology. Saunders C^o, 1950.
- THOMAS (J.-A.). — Exposés actuels de biologie cellulaire.
- Problèmes de structures, d'ultrastructures et de fonctions cellulaires, 1955.
 - Les facteurs de la croissance cellulaire : activation et inhibition, 1956.
 - Mécanismes d'auto-reproduction, 1957.
 - Problèmes d'organisation et de fonction chez les bactéries et les virus, 1958.
 - Problèmes d'infrastructure et de fonctions nucléaires, 1959. Masson et C^{ie}, Edit., Paris.
-

BIBLIOGRAPHIE

1. ACKERMANN (W.-W.), RABSON (A.) et KURTZ (H.). — Growth characteristics of poliomyelitis virus in Hela cell cultures : lack of parallelism in cellular injury and virus increase. *J. exper. Med.*, 1954, (100), 437-450.
2. ALBANO (A.). — Uber einige einfache Methoden zur Konzentration von Viren. *Zent. Bak. Par. Inf. Hyg.*, 1961, (181), 451-455.
3. ALLISON (A.-C.), PEREIRA (H.-G.) et FARTHING (C.-P.). — Investigation of adenovirus antigens by agar gel diffusion techniques. *Virology*, 1960, (10), 316-328.
4. ANDERSON (S.-G.), dans BURNET (F.-M.) et STANLEY (W.-M.): — The Viruses : biochemical, biological and biophysical properties. Animal viruses, vol. 3. *Acad. Press*, New-York, 1959, p. 21-50.
5. ANDREWES (C.-H.), BURNET (F.-M.), ENDERS (J.-F.), GARD (S.), HIRST (G.-F.), KAPLAN (M.-M.) et ZHDANOV (V.-M.). — Taxonomy viruses infecting vertebrates : present knowledge and ignorance. *Virology*, 1961, (15), 52-55.
6. AOYAMA (Y.). — Changes of cultured cells infected with measles virus. *Jap. J. Exp. Med.*, 1959, (29), 535-545.
7. ARMSTRONG (J.-A.). — Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence. *Exp. Cell Res.*, 1956, (11), 640-643.
8. ARMSTRONG (J.-A.) et HOPPER (P.-K.). — Fluorescence and phase contrast microscopy of human cell cultures infected with adenovirus. *Exp. Cell Res.*, 1959, (16), 584-594.
9. ARMSTRONG (J.-A.) et PEREIRA (H.-G.). — Significance of cytopathic effects observed during the growth of adenovirus. *Exp. Cell Res.*, 1960, (21), 144-150.
10. ATANASIU (P.) et LÉPINE (P.). — Etude morphologique en microscopie électronique sur coupes ultrafines, d'un virus (virus GAL) présent dans la souche RPL 12 du virus de la leucose aviaire. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, (98), 915-919.
11. BAKER (R.-F.), GORDON (I.) et RAPP (F.). — Electron dense crystallites in nuclei of human amnion cells infected with measles virus. *Nature*, 1960, (185), 790-791.
12. BALDUCCI (D.), ZAIMAN (E.) et TYRRELL (D.-A.-J.). — Laboratory studies of APC and influenza C viruses. *Brit. J. Exp. Path.*, 1956, (37), 205-218.
13. BALDUCCI (D.), ANDREONI (G.), GORI (G.-B.), CASTELLI (L.) et MANCINI (G.). — Cytopathic index : a new method for the quantitative evaluation of tissue culture infectivity of different virus strains. *J. Bacteriol.*, 1960, (79), 379-383.
14. BALDUZZI (P.) et VOLTERRA (G.). — Frequenza delle mitosi in cellule KB infettate da adenovirus. *Lo Sperimentale*, 1960, (110), 143-149.
15. BARRAL-VANEL (A.-M.). — Hémagglutination par certains types de virus ECHO. Bilan critique des faits acquis et recherches. *Thèse Pharmacie*, Lyon, 1962.
16. BARSKI (G.). — Tubes à lamelle applicables à différentes techniques de culture de tissus. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, (90), 512-513.
17. BARSKI (G.). — Caractère spécifique de la lésion cellulaire causée in vitro par les virus du groupe APC et sa valeur diagnostique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, (91), 614-622.

18. BARSKI (G.). — Epithéliums différenciés ciliés, sexuel et respiratoire et infection virale in vitro. VII^e Congrès International de Microbiologie, Stockholm (1958). (Résumés de travaux présentés à sessions de rapports, Edit. Tunevall, C., 1958).
19. BARSKI (G.), ROBINEAUX (R.) et ENDO (M.). — Phase contrast cinematography of cellular lesion produced by poliomyelitis virus in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, (88), 57-59.
20. BARSKI (G.) et ROBINEAUX (R.). — Chambre à perfusion démontable et stérilisable pour cultures de tissus de longue durée. *Ann. Inst. Pasteur*, 1596, (90), 514-517.
21. BARSKI (G.), KOURILSKY (R.) et CORNEFERT (F.). — Resistance of respiratory ciliated epithelium to action of polio and adenoviruses in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, (96), 386-391.
22. BARSKI (G.) et CORNEFERT (F.). — Aspects distinctifs des lésions cellulaires causées in vitro par différents types d'adénovirus. Etude de 20 souches appartenant à six types d'adénovirus. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, (94), 724-731.
23. BEALE (A.-J.), DOANE (F.) et ORMSBY (H.-L.). — Studies on adenovirus infections of the eye in Toronto. *Amer. J. Ophthalm.*, 1957, (43), 26-31.
24. BELL (T.-M.), TURNER (G.), Mc DONALD (A.) et HAMILTON (D.-A.). — Type 3 adenovirus infection. *Lancet*, 1960, (2), 1327-1329.
25. BELLELLI (E.), VITALI (M.-A.) et MONACI (V.). — Sulla tippizzazione degli adenovirus con la prova di I.E.A. *Ann. Sclavo*, 1961, (3), 161-170.
26. BENSIMON (P.). — Etude épidémiologique, clinique et biologique des infections à adénovirus. *Thèse Médecine*, Lyon, 1956.
27. BERMAN (L.), STULBERG (C.-S.) et RUDDLE (F.-H.). — Long term tissue culture of human bone-marrow. I. Report of isolation of a patient with carcinoma of the lung. *Blood*, 1955, (10), 896-911.
28. BERTALANFFY (L.) et BICKIS (I.). — Identification of cytoplasmic basophilia (ribonucleic acid) by fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 1956, (4), 481-493.
29. BESSIS (M.) et BRETON-GORIUS (J.). — Iron particles in normal erythroblasts and normal and pathological erythrocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1957, (3), 503-504.
30. BETZ (A.) et MAURIN (J.). — Les inclusions intranucléaires éosinophiles d'aspect cristallin produites par les adénovirus de types 5 et 6. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, (101), 120-124.
31. BINN (L.-N.), HILLEMANN (M.-R.), RODRIGUEZ (J.-E.) et GLABERE (R.-R.). — Antigenic relationships among adenoviruses with appraisal of reliability of complement fixation test for typing isolates. *J. Immunol.*, 1958, (80), 501-508.
32. BLACK (F.-L.). — Growth and stability of measles virus. *Virology*, 1959, (7), 184-192.
33. BLOCH (D.-P.), MORGAN (C.), GODMAN (G.-C.), HOWE (C.) et ROSE (H.-M.). — A correlated histochemical and electron microscopic study of the intranuclear crystalline aggregates of adenovirus RI-APC virus) in HeLa cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1957, (3), 1-8.
34. BONIFAS (V.) et SCHLESINGER (R.-W.). — Nutritional requirements for plaque production by adenovirus. *Fed. Proc.*, 1959, (18), 600.

35. BOYD (W.-C.). — Use of logarithms in recording serological reactions. *Nature*, 1958, (181), 1348.
36. BOYDEN (S.-V.). — The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. exper. Med.*, 1951, (93), 107-120.
37. BOYER (G.-S.), LEUCHTENBERGER (C.) et GINSBERG (H.-S.). — Cytological and cytochemical studies of HeLa cells infected with adenoviruses. *J. exper. Med.*, 1957, (105), 195-216.
38. BOYER (G.-S.), DENNY (F.-W.) et GINSBERG (H.-S.). — Intracellular localization of type 4 adenovirus : II. Cytological and fluorescein-labelled antibody studies. *J. exper. Med.*, 1959, (109), 85-96.
39. BOYER (G.-S.), DENNY (F.-W.) et GINSBERG (H.-S.). — Sequential cellular changes produced by types 5 and 7 adenoviruses in HeLa cells and in human amniotic cells. Cytological studies aided by fluorescein-labelled antibody. *J. exper. Med.*, 1959, (110), 827-844.
40. BOYER (G.-S.), DENNY (F.-W.), MILLER (I.) et GINSBERG (H.-S.). — Correlation of production of infectious virus with sequential stages of cytologic alteration in HeLa cells infected with adenoviruses types 5 and 7. — *J. exper. Med.*, 1960, (112), 865-882.
41. BRENNER (S.) et HORNE (R.-W.). — A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, (34), 103-109.
42. BURMESTER (B.-R.), SHARPLESS (G.-R.) et FONTES (A.-K.). — Virus isolated from avian lymphomas correlated to lymphomatosis virus. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1960, (24), 1443-1447.
43. CAILLEAUX (R.) (cité par JAWETZ (E.), HANNA (L.), NICHOLAS (A.) et HOYT (R.). — Some biological characteristics of adenovirus type 8. *Amer. J. Hyg.*, 1958, (67), 276-285.
44. CARMICHAEL (L.-E.) et BARNES (F.-D.). — Serological comparisons between infectious canine hepatitis virus and human adenovirus types. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1961, (107), 214-218.
45. CARREL (A.) et BURROWS (M.-T.). — Cultivation of tissue in vitro and its technique. *J. exper. Med.*, 1911, (13), 387-395.
46. CHANEL (J.). — Etude sur les troubles de l'absorption intestinale des hexoses et des pentoses causés par le manque d'oxygène et de l'excès d'acide carbonique. Bases enzymatiques des modifications de transit. *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Lyon, 1956.
47. CHARDONNET (Y.). — Etude de l'immunité expérimentale du cobaye contre le virus des oreillons. I. Recherche des facteurs influençant la production d'anticorps fixant le complément après immunisation primaire. *Rev. Immunol.*, 1958, (22), 166-190. — II. Recherches sur les modalités d'apparition d'anticorps fixant le complément après immunisation secondaire (phénomène de rappel). *Rev. Immunol.*, 1958, (22), 191-221.
48. CHARDONNET (Y.), PRUNIERAS (M.) et SOHIER (R.). — Effets cytopathogènes des adénovirus type 5. I. Aspects morphologiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, (100), 777-785.
49. CHARDONNET (Y.), SOHIER (R.) et PRUNIERAS (M.). — Etudes sur le comportement de la fraction soluble antigénique (fixation du complément) dans les cultures cellulaires infectées par l'adénovirus 1. *Rev. Immunol.*, 1961, (25), 305-343.
50. CHARDONNET (Y.), PRUNIERAS (M.) et SOHIER (R.). — Effets cytopathogènes des adénovirus type 5. III. Les phosphatases acides. *Ann. Inst. Pasteur.*, 1962, (102), 129-136.

51. COLEMAN, dans GLICK (D.). — *Technics of histo and cytochemistry. Interscience publishers, Inc. New-York, 1949, p. 67.*
52. CORDIER (G.), CORDIER (M.) et CHARDONNET (Y.). — Etude de l'hémo-concentration chez la roussette (*Scyllium canicula* L.) au cours du choc ischémique. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, (148), 1822-1823.
53. CORSELLO (A.) et DOSSENA (G.). — Comportamento dell'effeto citopatico dell'antigene F.C. nell'adenovirus tipo 4. *Ateneo Parmense*, 1961, (32), 3-7.
54. CORSI (O.-B.) et HARKEVITCH (N.). — Modificazioni morfologiche di cellule KB infette da adenovirus tipo 5. Colorazione degli acidi nucleinici con arancio di acridina. *Lo Sperimentale*, 1960, (110), 250-263.
55. COX (H.-R.). — Viral and rickettsial toxins. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1953, (7), 197-218.
56. CRANDELL (R.-A.) et GANAWAY (J.-R.). — A study of the antigenic relationships between-feline and human viruses. *Virology*, 1960, (11), 650-651.
57. CRUICKSHANK (C.-N.-D.), COOPER (J.-R.) et CONRAN (M.-D.). — A new tissue culture chamber. *Exp. Cell Res.*, 1959, (16), 695-698.
58. DALTON (A.-J.). — Golgi apparatus and secretion granules. Dans BRACHET (J.) et MIRSKY (A.-E.). — *The Cell: Biochemistry, Physiology, Morphology*, vol. (2), p. 603-619. *Acad. Press, New-York*, 1961.
59. DANIEL (Ph.), SLIZEWICZ (P.) et LÉPINE (P.). — Effet des produits d'hydrolyse enzymatique du sérum de poulain sur la croissance des cellules de la souche HeLa. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, (93), 766-771.
60. DARNELL (J.-E.) et EAGLE (H.). — Glucose and glutamine in poliovirus production by HeLa cells. *Virology*, 1958, (6), 556-566.
61. DARNELL (J.-E.), EAGLE (H.) et SAWYER (T.-K.). — The effect of cell population on density on the aminoacid requirements for poliovirus synthesis in HeLa cells. *J. exper. Med.*, 1959, (110), 445-450.
62. DAVIDSON (J.-N.). — *La biochimie des acides nucléiques*. Dunod Edit., Paris, 1960.
63. DAVIES (M.-C.) et ENGLERT (M.-E.). — The icosahedral shape of GAL virus. *Virology*, 1961, (13), 143-144.
64. DE DUVE (C.), PRESSMAN (B.-C.), GIANETTO (R.-J.), WATTIAUX (R.) et APPELMANS (F.). — Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.*, 1955, (60), 604-617.
65. DEFENDI (V.). — Application des techniques cytochimiques à l'étude de l'interaction virus-cellules. 1^{er} Congrès international d'histochemie et de cytochimie, Paris, 1960. Résumés. *Pergamon Press*.
66. DENNY (F.-W.), BOYER (G.-S.) et GINSBERG (H.-S.). — Characteristics of adenovirus types 5, 6 and 7. *Fed. Proc.*, 1958, (17), 509.
67. DENNY (F.-W.) et GINSBERG (H.-S.). — Intracellular localization of type 4 adenovirus. I. Cellular fractionation studies. *J. exper. Med.*, 1959, (109), 69-83.
68. DENNY (F.-W.) et GINSBERG (H.-S.). — Certain biological characteristics of adenovirus types 5, 6, 7 and 14. *J. Immunol.*, 1961, (86), 567-574.
69. DESSAUX (G.). — La réserve glycogénique du cœur des mammifères. Etude expérimentale des variations du taux de glycogène cardiaque chez le rat, sous l'influence des modifications de tension des gaz du sang et dans divers états de choc. *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Lyon, 1955.

70. DEYSSON (G.) et LONGEVIALLE (M.). — Contribution à l'étude biochimique de la mitose : la « gélotion » mitotique est-elle analogue à la coagulation sanguine ? *Biol. Med.*, 1962, (51), 42-110.
71. DI MAYORCA (G.-A.), EDDY (B.-E.), STEWART (S.-E.), HUNTER (W.-S.), FRIEND (C.) et BENDICH (A.). — Isolation of infectious deoxyribonucleic acid from SE polyoma-infected tissue cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1959, (45), 1805-1808.
72. DISCHE (Z.), dans CHARGAFF (E.) et DAVIDSON (J.-N.). — The Nucleic Acids. *Acad. Press*, New-York, 1955, Vol. (1), p. 285.
73. DOSSENA (G.). — Coltura degli adenovirus su cellule umane ed animali. *Ann. Sclavo*, 1961, (3), 171-177.
74. DOSSENA (G.). — Resistenza degli adenovirus tipo 1, 2, 5 e 6 a varie temperature. *Ann. Sclavo*, 1961, (3), 178-183.
75. DROUHET (V.). — Etude d'un virus APC (Adénovirus) isolé d'un cas de pneumonie mortelle. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, (93), 138-141.
76. DULBECCO (R.). — Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1952, (32), 747-752.
77. DULBECCO (R.) et VOGT (M.). — Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. exper. Med.*, 1954, (99), 167-182.
78. DUNCAN (I.-B.-R.). — Human thyroid tissue culture in diagnostic virology. *Arch. Virusforsch.*, 1960, (10), 490-500.
79. DUNCAN (I.-B.-R.). — Adenovirus type 15 and human thyroid tissue culture. *Lancet*, 1960, (9), 829-830.
80. EAGLE (H.). — Utilization of dipeptides by mammalian cells in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, (89), 96-99.
81. EAGLE (H.). — Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain KB. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, (89), 362-364.
82. EAGLE (H.). — Nutritional needs mammalian cells in tissue culture. *Science*, 1955, (122), 501-504.
83. EAGLE (H.). — The specific aminoacid requirements of a human carcinoma cells (strain HeLa) in tissue culture. *J. exper. Med.*, 1955, (102), 37-48.
84. EAGLE (H.). — The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies and their cure. *J. exper. Med.*, 1955, (102), 595-600.
85. EAGLE (H.). — The specific aminoacid requirements of a mammalian cell (strain L in tissue culture). *J. Biol. Chem.*, 1955, (214), 839-852.
86. EAGLE (H.). — The nutritional requirements of the propagation of Poliovirus by the HeLa cells. *J. exper. Med.*, 1956, (104), 271-287.
87. EAGLE (H.). — Relative growth. Promoting activity in tissue culture of co-factors and the parent vitamins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, (91), 358-361.
88. EAGLE (H.), HABEL (K.), ROWE (W.-P.) et HUEBNER (R.-J.). — Viral susceptibility of a human carcinoma cell (strain KB). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, (91), 361-364.
89. EAGLE (H.), OYAMA (V.-I.), LEVY (M.), MORTON (C.-L.) et FLEISCHMAN (R.). — The growth response of mammalian cells in tissue culture to L glutamine and L glutamic acid. *J. Biol. Chem.*, 1956, (218), 607-617.

90. EARLE (W.-R.). — Production of Malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1943, (4), 165-212.
91. EARLE (W.-R.), BRYANT (J.-C.), SCHILLING (E.-L.) et EVANS (V.-J.). — Growth of cell suspensions in tissue culture. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 1956, (63), 666-682.
92. EASTY (G.-C.) et MERCER (E.-H.). — The fine structure of the surfaces of normal and tumour cells in tissue culture. *Path. Biol.*, 1961, (9), 591-596.
93. EDDY (B.-E.), BORMAN (G.-S.), BERKELEY (W.) et YOUNG (R.-D.). — Tumours induced in hamsters by injection of rhesus kidney cell extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1961, (107), 191-197.
94. ENDERS (J.-F.). — Bovine amniotic fluid as tissue culture medium in cultivations of poliomyelitis and other viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1953, (82), 100-105.
95. ENJALBERT (L.), DIDIER (J.), LARENG (M.-B.) et LAPCHINE (L.). — Les adénovirus. Etude de 17 souches isolées à Toulouse. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, (99), 608-617.
96. EPSTEIN (M.-A.). — An investigation into the purifying effect of a fluorocarbon on vaccinia virus. *Brit. J. Exp. Path.*, 1958, (39), 436-446.
97. EPSTEIN (M.-A.). — Observations on the fine structure of type 5 adenovirus. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, (6), 523-524.
98. EPSTEIN (M.-A.) et HOLT (S.-J.). — Observations on the Rous virus ; integrated electron microscopical and cytochemical studies of fluorocarbon purified preparations. *Brit. J. Cancer*, 1958, (12), 363-369.
99. EPSTEIN (M.-A.) et POWELL (A.-K.). — The isolation of type 5 adenovirus using a fluorocarbon ; combined morphological and biological studies. *Brit. J. Exp. Path.*, 1960, (41), 559-566.
100. EPSTEIN (M.-A.), HOLT (S.-J.) et POWELL (A.-K.). — The fine structure and composition of type 5 adenovirus ; an integrated electron microscopical and cytochemical study. *Brit. J. Exp. Path.*, 1960, (41), 567-575.
101. EPSTEIN (M.-A.) et HOLT (S.-J.). — Site and nature of adenovirus nucleic acid. *Nature*, 1960, (187), 1050-1051.
102. EPSTEIN (M.-A.) et HOLT (S.-J.). — Integrated electron microscopical and cytochemical studies on the structure and composition of type 5 adenovirus. *Path. Biol.*, 1961, (9), 707-710.
103. EVANS (A.-S.). — Establishment of human tonsil cells in continuous culture and their viral susceptibilities. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, (96), 752-757.
104. EVANS (A.-S.). — Latent adenovirus infections of the human respiratory tract. *Amer. J. Hyg.*, 1958, (67), 256-266.
105. EVERETT (S.-F.) et GINSBERG (H.-S.). — A toxin like material separable from type 5 adenovirus particles. *Virology*, 1958, (6), 770-771.
106. FALKE (D.) et RICHTER (I.-E.). — Mikrokinematographische Studien über die Entstehung von Riesenzellen durch Herpes - B - Virus in Zellkulturen. I. Vorgänge an den Zellgrenzen und Granulabewegungen. *Arch. Virusforsch.*, 1961, (11), 73-85. — II. Morphologisches Verhalten und Bewegungen der Kerne. *Arch. Virusforsch.*, 1961, (11), 86-99.
107. FASTIER (L.-B.). — Mitotic activity of virus infected cells. *Virology*, 1960, (10), 542-548.

108. FAURE (J.-P.). — L'extraction des acides nucléiques biologiquement actifs : les acides nucléiques infectieux. Dans THOMAS (J.) : Exposés actuels de Biologie cellulaire. Masson et C^{ie}, Edit., Paris, 1959, p. 127-196.
109. FEBVRE (H.), HAREL (H.) et ARNOULT (J.). — Observations pendant la phase muette du développement intracellulaire du virus du fibrome de Shope, du corps d'inclusion diffus sans virus corpusculaires correspondant avec la présence d'un antigène soluble. *Bull. Cancer*, 1957, (44), 92-105.
110. FEBVRE (H.), cité par BARSKI (G.) et CORNEFERT (F.). — Aspects distinctifs des lésions cellulaires causées in vitro par différents types d'adénovirus. Etude de 20 souches appartenant à 6 types d'adénovirus. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, (94), 724-731.
111. FICQ (A.). — La physiologie du nucléole, dans THOMAS (J.-A.) : Exposés actuels de Biologie cellulaire. Masson et C^{ie}, Edit., Paris, 1959, p. 35-63.
112. FISCHER (T.-N.) et GINSBERG (H.-S.). — Accumulation of organic acids by HeLa cells infected with type 4 adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, (95), 47-51.
113. FISKE (C.-H.) et SUBBAROW (Y.). — The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 1925, (66), 375-400.
114. FLANAGAN (J.-F.) et GINSBERG (H.-S.). — Effect of 5-fluorodeoxyuridine on synthesis of type 4 adenovirus. *Fed. Proc.*, 1961, (20 pt 1), 445.
115. FLANAGAN (J.-F.) et GINSBERG (H.-S.). — Synthesis of virus-specific polymers in adenovirus infected cells effects of 5-fluorodeoxyuridine. *J. exper. Med.*, 1962, (116), 141-157.
116. FLEURETTE (J.). — Les éruptions morbilliformes et rubélistiques à virus et leur diagnostic biologique chez l'enfant. *Thèse Med.*, Lyon, 1961.
117. FOGH (J.) et LUND (R.-O.). — Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, (94), 532-537.
118. FOGH (J.) et STUART (D.-C.). — Intracytoplasmic crystalline and non crystalline patterns of Coxsackie virus in FL cells. *Virology*, 1959, (9), 705-708.
119. FOGH (J.) et STUART (D.-C.). — Intracellular crystals of poliovirus in HeLa cells. *Virology*, 1960, (11), 308-311.
120. FOGH (J.), LUND (R.-O.) et Mc CLAIN (M.-E.). — Sensitivity of FL cells to polio and adenoviruses. *Arch. Virusforsch.*, 1960, (9), 559-570.
121. FONTES (A.-K.), BURMEISTER (B.-R.), WALTER (W.-G.) et ISELER (P.-E.). — Growth in tissue culture of cytopathogenic agent from strain of virus which produces avian lymphomatosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, (97), 854-857.
122. FORSYTH (P.-J.) et ROIZMAN (B.). — Concentration and partial purification of adenovirus type 2 complement-fixing antigen. *Virology*, 1958, (5), 393-394.
123. FREDERIC (J.). — Recherches cytologiques sur le chondriome normal ou soumis à l'expérimentation dans des cellules vivantes cultivées in vitro. *Arch. Biol.*, 1958, (69), 169-349.
124. FRISCH (A.-W.), JENTOFT (V.), BARGER (R.) et LOSLI (E.-J.). — A human epithelium-like cell (MABEN) derived from and adenocarcinoma of lung. Isolation, continuous propagation and effects of selected viruses. *Amer. J. Clin. Path.*, 1955, (25), 1107-1112.

125. FRIEDMAN (M.) et BENNETT (C.-R.). — A hemagglutination test for detection of adenovirus antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, (94), 712-718.
126. FRIEDMAN (M.) et DE BERRY (P.). — Thermal differentiation of the adenovirus complement fixing antigens. *J. Immunol.*, 1959, (82), 535-541.
127. FUKUMI (H.), NISHIKAWA (F.) et EJIMA (S.). — The relationship between cytopathic changes and virus multiplication in HeLa cells infected with adenovirus. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 1957, (10), 321-328.
128. GARD (S.). — Neutralization of Theiler's virus. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1955, (37), 21-30.
129. GAUDIN (G.). — La culture des cellules amniotiques humaines et leur emploi en virologie. *Thèse Méd.*, Lyon, 1960.
130. GAUDIN (G.), SOHIER (R.), CROCE (D.) et CASSON (M.). — La culture des cellules amniotiques humaines. Etude critique des facteurs susceptibles d'influencer la réussite des primocultures. *Path. Biol.*, 1961, (9), 2075-2082.
131. GAY (H.). — Cytochemical localization of cellular nucleic acids and proteins and determination of their patterns of association. *Ann. Histochimie*, 1961, (6), 467-476.
132. GERBER (P.). — An infectious deoxyribonucleic acid derived from vacuolating virus (SV 40). *Virology*, 1962, (16), 96-97.
133. GESSLER (A.-E.), BENDER (C.-E.) et PARKINSON (M.-C.). — A new rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deproteinization. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 1956, (18), 701-703.
134. GEY (G.-O.), COFFMAN (W.-D.) et KUBICEK (M.-T.). — Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, 1952, (12), 264-265.
135. GINSBERG (H.-S.). — Characteristics of the new-respiratory viruses adenoviruses. II. Stability to temperature and pH alterations. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, (93), 48-52.
136. GINSBERG (H.-S.). — Biological and biophysical properties of the adenoviruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1956-57, (67), 383-391.
137. GINSBERG (H.-S.). — Characteristics of the adenoviruses. III. Reproductive cycle of types 1 to 4. *J. exper. Med.*, 1958, (107), 133-152.
138. GINSBERG (H.-S.). — Nature of the biochemical changes in adenovirus infected cells. *Science*, 1960, (132), 1492.
139. GINSBERG (H.-S.), GOLD (E.) et JORDAN (W.-S.). — Tryptose phosphate broth as a supplementary factor for maintenance of HeLa cell tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, (89), 66-71.
140. GINSBERG (H.-S.) et DIXON (M.-K.). — Deoxyribonucleic acid (DNA) and protein alterations in HeLa cells infected with type 4 adenovirus. *J. exper. Med.*, 1959, (109), 407-422.
141. GINSBERG (H.-S.) et DIXON (M.-K.). — Nucleic acid synthesis in types 4 and 5 adenovirus-infected HeLa cells. *J. exper. Med.*, 1961, (113), 283-299.
142. GLINOS (A.-D.). — L'influence des fonctions du cytoplasme sur le noyau pendant la croissance. Dans THOMAS (J.-A.) : exposés actuels de biologie cellulaire. Masson et C^e, Edit., Paris, 1959, p. 197-217.
143. GODMAN (G.-C.), MORGAN (C.), BREITENFIELD (P.-M.) et ROSE (H.-M.). — A correlative study by electron and light microscopy of the development of type 5 adenovirus. II. Light microscopy. *J. exper. Med.*, 1960, (112), 383-402.

144. GOLD (E.) et GINSBERG (H.-S.). — Inhibition of adenoviruses by normal animal sera. *Fed. Proc.*, 1957, (16), 414-415.
145. GOLD (E.) et GINSBERG (H.-S.). — An inhibitor of adenovirus in ox serum. *J. Immunol.*, 1962, (88), 513-518.
146. GOMORI (G.). — Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions. *Arch. Path.*, 1941, (32), 189-198.
147. GRAYSTON (J.-T.), LOOSLI (C.-G.), SMITH (M.), Mc CARTHY (M.-A.) et JOHNSTON (P.-B.). — Adenoviruses. I. The effect of total incubation time in HeLa cell cultures on the isolation rate. *J. Inf. Dis.*, 1958, (103), 75-85.
148. GRAYSTON (J.-T.), Mc CARTHY (M.-A.), SMITH (M.) et LOOSLI (C.-G.). — Adenoviruses II. The sensitivity of different tissue culture strains of cells to adenovirus. *J. Inf. Dis.*, 1958, (103), 86-92.
149. GREEN (M.). — Biochemical studies on adenovirus multiplication. I. Stimulation of phosphorus incorporation into deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid. *Virology*, 1959, (9), 343-358.
150. GREEN (M.) et DAESCH (G.-E.). — Nucleic acid and protein synthesis in adenovirus infected cells. *Fed. Proc.*, 1960, (19), 387.
151. GREEN (M.) et DAESCH (G.-E.). — Biochemical studies on adenovirus multiplication. II. Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures. *Virology*, 1961, (13), 169-176.
152. GREEN (M.-H.) et VERNEY (E.-L.). — A simple method for the study of intracellular acid phosphatase in HeLa cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 1956, (4), 106-109.
153. GREGG (M.-B.) and MORGAN (C.). — Reduplication of nuclear membranes in HeLa cells infected with adenovirus. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, (6), 539-540.
154. GUERIN (L.-F.) et GUERIN (M.-M.). — Susceptibility of pig kidney tissue cultures to certain viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, (96), 322-323.
155. HAMPARIAN (V.-V.), MULLER (F.) et HUMMELER (K.). — Elimination of nonspecific components from viral antigens by fluorocarbon. *J. Immunol.*, 1958, (80), 468-475.
156. HANKS (J.-H.) et WALLACE (R.-E.). — Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949, (71), 196-200.
157. HANNA (L.) et JAWETZ (E.). — Attempts to enhance infectivity of adenovirus type 8 for cell cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, (110), 707-709.
158. HARFORD (C.-G.), HAMLIN (A.), PARKER (E.) et RAVENSWAAY (Van T.). — Electron microscopy of HeLa cells infected with adenoviruses. *J. exper. Med.*, 1956, (104), 443-454.
159. HARTLEY (J.-W.), HUEBNER (R.-J.) et ROWE (W.-P.). — Serial propagation of adenoviruses (APC) in monkey kidney tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, (92), 667-669.
160. HARTLEY (J.-W.) et ROWE (W.-P.). — A new mouse virus apparently related to the adenovirus group. *Virology*, 1960, (11), 645-647.
161. HARUNA (I.), YAOI (H.), KONO (R.) et WANATABE (I.). — Separation of adenovirus by chromatography on DEAE cellulose. *Virology*, 1961, (13), 264-267.
162. HELLER (L.-A.) et SALENSTEDT (C.-R.). — One sided immunologic relation between adenovirus and infectious canine hepatitis antigens. *Virology*, 1960, (11), 640-645.

163. HENLE (G.), GIRARDI (A.) et HENLE (W.). — A non transmissible cytopathogenic effect of influenza virus in tissue culture accompanied by formation of non infectious hemagglutinins. *J. exper. Med.*, 1955, (101), 25-41.
164. HENLE (W.), HENLE (G.), HUMMELER (K.) et LIEF (F.). — The changing aspects of the serodiagnosis of viral infections. *J. Pediatrics*, 1961, (59), 827-835.
165. HENRY (M.). — Diagnostic biologique des affections à adénovirus. *Thèse Méd.*, Lyon, 1961.
166. HILLEMANN (M.-R.) et WERNER (J.-H.). — Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1954, (85), 183-188.
167. HILLEMANN (M.-R.), TOUSIMIS (A.-J.) et WERNER (J.-H.). — Biophysical characterization of the RI (RI-67) viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, (89), 587-593.
168. HILLEMANN (M.-R.), WARFIELD (M.-S.), ANDERSON (S.-A.) et WERNER (J.-H.). — Adenovirus (RI-APC-ARD) vaccine for prevention of acute respiratory illness. I. Vaccine development. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1957, (163), 4-9.
169. HOLZAEFFEL (J.-H.) et BOUTZELIS (J.-G.). — Use of APC 3 virus as cancericidal agent. *Cancer*, 1957, (10), 577-580.
170. HORNE (R.-W.), BRENNER (S.), WATERSON (A.-P.) et WILDY (P.). — The icosahedral form of an adenovirus. *J. Mol. Biol.*, 1959, (1), 84-86.
171. HORWATH (G.) et VANOTTI (A.). — Changement de teneur des acides nucléiques des cultures de tissus au cours de l'infection du virus de vaccine. *Medicine Experimentalis*, 1962 (à paraître).
172. HOTCHKISS (R.), dans COLOWICK (S.-P.) et KAPLAN (N.-O.). — Methods in Enzymology. *Acad. Press*, New-York, 1957, vol. 3, p. 680.
173. HSIUNG (G.-D.) et GAYLORD (W.-H.). — The vacuolating virus of monkeys. I. Isolation, growth characteristics and inclusion body formation. *J. exper. Med.*, 1961, (114), 975-986.
174. HULL (R.-N.), MINNER (J.-R.) et SMITH (J.-W.). — New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. *Amer. J. Hyg.*, 1956, (63), 204-215.
175. HUEBNER (R.-J.), ROWE (W.-P.), WARD (T.-G.), PARROTT (R.-H.) et BELL (J.-A.). — Adenoidal - pharyngeal - conjunctival agents. A newly recognized group of common viruses of the respiratory system. *New England J. Med.*, 1954, (251), 1077-1086.
176. JAWETZ (E.), KIMURA (S.-J.), NICHOLAS (A.-N.), THYGESON (P.) et HANNA (L.). — New type of APC virus from epidemic keratoconjunctivitis. *Science*, 1955, (122), 1190-1191.
177. JAWETZ (E.), KIMURA (S.-J.), HANNA (L.), COLEMAN (V.-R.), THYGESON (P.) et NICHOLAS (A.). — Studies on the etiology of epidemic keratoconjunctivitis. *Amer. J. Ophthalm.*, 1955, (40), 200-209.
178. JAWETZ (E.), HANNA (L.), NICHOLAS (A.) et HOYT (R.). — Some biological characteristics of adenovirus type 8. *Amer. J. Hyg.*, (1958, (67), 276-285.
179. JAWETZ (E.), HANNA (L.), SONNE (M.) et THYGESON (P.). — A laboratory infection with adenovirus type 8. Laboratory and epidemiologic observations. *Amer. J. Hyg.*, 1959, (69), 13-20.
180. JORDAN (W.-S.). — Human nasal cells in continuous culture. I. Establishment of two lines of epithelial-like cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, (92), 867-871.

181. JORDAN (W.-S.). — Human nasal cells in continuous culture. II. Virus susceptibilities. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, (92), 872-875.
182. KAPLAN (A.-S.) et BEN-PORAT (T.). — The effect of pseudorabies virus on the nucleic acid metabolism and the nuclei of rabbit kidney cells. *Virology*, 1959, (8), 352-366.
183. KAPSENBERG (J.-G.). — Relationship of infectious canine hepatitis virus to human adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1959, (101), 611-614.
184. KASEL (J.-A.), ROWE (W.-P.) et NEMES (J.-L.). — A factor present in adenoviruses suspensions capable of modifying erythrocyte receptors. *Fed. Proc.*, 1960, (19), 400.
185. KASEL (J.-A.), ROWE (W.-P.) et NEMES (J.-L.). — Modification of erythrocyte-receptors by a factor in adenovirus suspensions. *Virology*, 1960, (10), 388-391.
186. KASEL (J.-A.), ROWE (W.-P.) et NEMES (J.-L.). — Further characterization of the adenovirus erythrocyte-receptor modifying factor. *J. exper. Med.*, 1961, (114), 717-728.
187. KEEBLE (S.-A.) et JAY (R.-F.). — Fluorescent staining for the differentiation of intracellular ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. *Nature*, 1962, (193), 695-696.
188. KELLY (B.) et PEREIRA (H.-G.). — Actions of adenoviruses types 5 and 7 in culture of rabbit kidney tissue. *Brit. J. Exp. Path.*, 1957, (38), 396-400.
189. KENDA (G.). — Einschlusskörper in den Epidermiszellen von *Chlorophytum comosum*. *Protoplasma*, 1961, (53), 305-319.
190. KJELLEN (L.) et SVEDMYR (A.). — Studies on Herpes simplex virus in tissue culture. *Arch. Virusforsch.*, 1954, (5), 373-378.
191. KJELLEN (L.). — Studies on an unidentified group of cytopathic agents. *Arch. Virusforsch.*, 1955, (6), 45-59.
192. KJELLEN (L.). — Studies on adenoviruses (APC, RI, ARD) in tissue culture: correlation between the amount of virus inoculated and the time needed for production of cellular degeneration. *Arch. Virusforsch.*, 1956, (7), 110-119.
193. KJELLEN (L.). — Studies on in vitro neutralization of adenoviruses. *Arch. Virusforsch.*, 1957, (7), 307-332.
194. KJELLEN (L.). — A study of adenovirus-host cell system by the plaque technique. *Virology*, 1961, (14), 234-239.
195. KJELLEN (L.), LAGERMALM (G.), SVEDMYR (A.) et THORSSON (K.-G.). — Crystalline-like patterns in the nuclei of cells infected with an animal virus. *Nature*, 1955, (175), 505-507.
196. KLEIN (M.), EARLY (E.) et ZELLAT (J.). — Isolation from cattle of a virus related to human adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1959, (102), 1-4.
197. KLEIN (M.), ZELLAT (J.) et MICHAELSON (T.-C.). — A new bovine adenovirus related to human adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, (105), 340-342.
198. KLEMPERER (H.-G.) et PEREIRA (H.-G.). — Study of adenovirus antigens fractionated by chromatography on DEAE cellulose. *Virology*, 1959, (9), 536-545.
199. KLISENKO (G.-A.). — A study of cytopathology of adenovirus infection in tissue cultures. *Vop. Virusol.*, 1961, (7), 348-352.
200. KOVACS (E.). — Comparative biochemical studies on normal and on poliomyelitis virus-infected tissue culture. V. Profound alteration of acid and alkalinephosphatase activity in infected rhesus kidney cells. *J. exper. Med.*, 1956, (104), 589-613.

201. KOVACS (E.), STURTZ (V.) et WAGNER (G.). — Direct biochemical method for enzyme-assays in living cell cultures. *Z. Naturforsch.*, 1960, (15), 116-128.
202. LAGERMALM (G.), KJELLEN (L.), THORSSON (K.-G.) et SVEDMYR (A.). — Electron microscopy of HeLa cells infected with agents of the adenovirus (APC - RI - ARD) group. *Arch. Virusforsch.*, 1957, (3), 221-241.
203. LAHELLE (O.). — Preparation of monolayer tissue cultures from human amniotic membrane. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1956, (39), 338-352.
204. LARKIN (E.-P.) et DUTCHER (R.-M.). — The cytopathic effect of tissue cultures inoculated with adenovirus before and after tissue lay down. *Bact. Proc.*, 1960, (M 23), 93.
205. LEADER (R.-W.), POMERAT (C.-M.) et LEFEBER (C.-G.). — Intranuclear « crystals » in dog-kidney cells infected with canine hepatitis virus. *Virology*, 1960, (10), 268-270.
206. LELONG (M.), LÉPINE (P.), ALISON (F.), LE TAN VINH, SATGE (P.), et CHANY (Ch.). — La pneumonie à virus du groupe APC chez le nourrisson. Isolement du virus. Les lésions anatomo-histologiques. *Arch. Franç. Pédiatrie*, 1956, (13), 1-5.
207. LÉPINE (P.). — Les virus. *Presses Universitaires de France*, 1961.
208. LÉPINE (P.), SLIZEWICK (P.), DANIEL (P.) et PACCAUD (M.). — Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysate de caséine comme source d'acides aminés. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, (90), 654-656.
209. LÉPINE (P.), CHANY (Ch.) et ROBBE-FOSSAT (F.). — Etude des virus APC. I. Isolement en France de virus du type APC (souches P 32 et P 44). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, (91), 607-613.
210. LÉPINE (P.), DANIEL (P.), PELMONT (J.) et SLIZEWICZ (P.). — Besoins nutritifs des cellules rénales de singe et des cellules de la souche HeLa cultivées in vitro. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, (92), 567-575.
211. LÉPINE (P.), CHANY (Ch.), MAURIN (J.) et CARRE (M.-C.). — Etude des virus APC (adénovirus). II. Evolution des lésions cellulaires provoquées par le virus in vitro. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, (92), 728-734.
212. LETTRE (R.) et SIEBS (W.). — Some studies of the nucleolus of cells cultivated in vitro. *Path. Biol.*, 1961, (9), 819-823.
213. LEUCHTENBERGER (C.) et BOYER (G.-S.). — The occurrence of intranuclear crystals in living HeLa cells infected with adenoviruses. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1957, (3), 323-324.
214. LEVINTOW (L.), EAGLE (H.) et PIEZ (K.-A.). — The role of glutamine in protein biosynthesis in tissue cultures. *J. Biol. Chem.*, 1957, (227), 929-941.
215. LEVY (H.-B.), ROWE (W.-P.), SNELLBAKER (L.-F.) et HARTLEY (J.-W.). — Biochemical changes in HeLa cells associated with infection by type 2 adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, (96), 732-738.
216. LIEBERMAN (M.) et FRIEDMAN (M.). — Growth characteristics of adenoviruses. I. Production and release of complement fixing antigens and infectious virus. *J. Immunol.*, 1959, (82), 1-8.
217. LISON (L.). — Histochimie et cytochimie animales. Gauthier-Villars, Edit., Paris, 1953.
218. LISON (L.). — Statistique appliquée à la biologie expérimentale. Gauthier-Villars, Edit., Paris, 1958.
219. LISON (L.). — Histochimie et cytochimie animales. Gauthier-Villars, Edit., Paris, 1960.

220. LO MONACO (G.-B.). — Linea di cellule HeLa proliferanti in terreno con siero di vitello. *Lo Sperimentale*, 1957, (107), 56-67.
221. LONGLEY (J.-B.). — Effectiveness of Schiff variants in the periodic-Schiff and Feulgen nuclear technics. *Stain Technol.*, 1952, (27), 161-169.
222. LORENZ (R.-J.). — Über den Einfluss des Pipettierfehlers auf die Genauigkeit bei der Konzentrationmessung von Viruslösungen. *Arch. Virusforsch.*, 1960, (10), 551-559.
223. LORENZ (R.-J.). — Untersuchungen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung und die Genauigkeit bei Virustitrierungen. *Arch. Virusforsch.*, 1960, (10), 560-577.
224. LOW (B.-W.) et PINNOCK (P.-R.). — Packing structure of crystalline RI - APC virus. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, (2), 483-486.
225. LOWRY (O.-H.), ROSENBOUGH (N.-J.), FASR (A.-L.) et RANDALL (R.-J.). — Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, (193), 265-275.
226. LWOFF (A.), HORNE (R.-W.) et TOURNIER (P.). — Un système de virus. *C. R. Acad. Sci.*, 1962, (254), 4225-4227.
227. MACPHERSON (I.), WILDY (P.), STOKER (M.) et HORNE (R.-W.). — The fine structure of GAL - an avian orphan virus. *Virology*, 1961, (13), 146-148.
228. MAGEE (W.-E.) et SAGIK (B.-P.). — The synthesis of deoxyribonucleic acid by HeLa cells infected with vaccinia virus. *Virology*, 1959, (8), 134-137.
229. MEJBAUM (W.), cité par SCHMIDT (G.), dans COLOWICK (S.-P.) et KAPLAN (N.-O.). — Methods in Enzymology. *Acad. Press*, New-York, 1957, vol. 2, p. 680.
230. MELNICK (J.-L.). — Tissue culture techniques and their application to original isolation, growth and assay of poliomyelitis and orphan viruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1955, (61), 754-773.
231. MELNICK (J.-L.). — Tissue culture methods for the cultivation of Poliomyelitis and other viruses, in : Diagnostic Procedures for virus and Rickettsial diseases. 2nd Edit. Publication office American Public Health Association. New-York, 1956, p. 97-151.
232. MELNICK (J.-L.) et RIORDAN (J.-T.). — Poliomyelitis virus in tissue culture. IV. Protein free nutrient media in stationary and roller tube culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1952, (81), 208-213.
233. MOORE (A.-E.), SABACHEWSKY (L.) et TOOLAN (H.-W.). — Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.*, 1955, (15), 598-602.
234. MOORE (D.-J.) et RANDALL (C.-C.). — Changes in protein and nucleic acid content on HeLa cells, infected with equine abortion virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, (99), 782-785.
235. MORGAN (J.-F.), MORTON (H.-J.) et PARKER (R.-C.). — Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, (73), 1-8.
236. MORGAN (C.), HOWE (C.), ROSE (H.-M.) et MOORE (D.-H.). — Structure and development of viruses observed in the electron microscope. IV. Structure of the RI - APC group. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, (2), 351-359.
237. MORGAN (C.), MOORE (D.-H.) et ROSE (H.-M.). — Some effects of the microtome knife and electron beam on methacrylate-embedded thin sections. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, (2), suppl. 21-28.

238. MORGAN (C.), GODMAN (G.-C.), ROSE (H.-M.), HOWE (C.) et HUANG (J.-S.). — Electron microscopic and histochemical studies of an unusual crystalline protein occurring in cells infected by type 5 adenovirus. Preliminary observations. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1957, (3), 505-508.
239. MORGAN (C.), ROSE (H.-M.) et MOORE (D.-H.). — An evaluation of host-cell changes accompanying viral multiplication as observed in the electron microscope. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 1957-58, (68), 302-323.
240. MORGAN (C.), JONES (E.-P.), HOLDEN (M.) et ROSE (H.-M.). — Intracellular crystals of Herpes simplex observed with the electron microscope. *Virology*, 1958, (5), 568-571.
241. MORGAN (C.), GODMAN (G.-C.), BREITENFIELD (P.-M.) et ROSE (H.-M.). — A correlative study by electron and light microscopy of the development of type 5 adenovirus. I. Electron microscopy. *J. exper. Med.*, 1960, (112), 373-382.
242. NASZ (I.) et TOTH (M.). — Studies on the cytopathic changes caused by different types of the adenovirus group in human amnion and Detroit-6 cell cultures. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 1958, (5), 377-382.
243. NASZ (I.) and TOTH (M.). — Cytomorphological changes in human embryonic kidney tissue cultures infected with adenovirus type 5 strains. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 1959, (6), 85-92.
244. NASZ (I.) et TOTH (M.). — Further studies on the cytopathogenic effect of adenoviruses in human amniotic cell cultures. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 1960, (7), 145-150.
245. NAUDE (W.-T.), MADSEN (T.) et POLSON (A.). — Different sized infective particles of Rift Valley Fever Virus. *Nature*, 1954, (173), 1051-1053.
246. NEVA (F.-A.) et ENDERS (J.-F.). — Isolation of cytopathic agent from an infant with a disease in certain respects resembling roseola infantum. *J. Immunol.*, 1954, (72), 315-321.
247. NEWTON (A.) et STOKER (M.-G.-P.). — Changes in nucleic acid content of HeLa cells infected with herpes virus. *Virology*, 1958, (5), 549-560.
248. NOVIKOFF (A.-B.). — The intracellular localization of chemical constituents, dans MELLORS (R.-C.) : *Analytical Cytology*. Mc Graw Hill Book Company Inc., 2nd Edit., 1959.
249. NOVIKOFF (A.-B.). Lysosomes and related particles, dans BRACHET (J.) et MIRSKY (A.-E.). — *The Cell : Biochemistry, Physiology, Morphology*. Acad. Press, New-York, 1961, vol. 2, p. 423-488.
250. OGUR (M.) et ROSEN (G.). — The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, 1950, (25), 262-276.
251. ORFILA (J.). — Etude de l'action cytopathogène de l'adénovirus type 7, en cultures cellulaires. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, (94), 794-797.
252. OSTER (G.). — The isoelectric points of some strains of tobacco mosaic virus. *J. Biol. Chem.*, 1952, (190), 55-59.
253. PAUL (J.). — Cell and tissue culture. Edinburg and London, ES, Livingston, 1959.
254. PAUL (J.). — Biochemical characteristics of normal and cancer cells in culture. *Path. Biol.*, 1961, (9), 529-532.
255. PEARSE (A.-G.-E.). — *Histochemistry : theoretical and applied*. Little Brown and Company, Edit. Boston, 1960.

256. PEREIRA (H.-G.). — Typing of adenoidal-pharyngeal-conjunctival (APC) viruses by complement fixing. *J. Path. Bact.*, 1956, (72), 105-109.
257. PEREIRA (H.-G.). — A protein factor responsible for the early cytopathic effect of adenovirus. *Virology*, 1958, (6), 601-611.
258. PEREIRA (H.-G.). — Inactivation of adenovirus by ultraviolet radiation. VII^e Congrès international de Microbiologie, Stockholm, 1958. — Résumés de travaux présentés à sessions de rapports. Edit. Tunevall G., 1958.
259. PEREIRA (H.-G.). — Adenoviruses. *Brit. Med. Bull.*, 1959, (15), (225-230).
260. PEREIRA (H.-G.). — A virus inhibitor produced in Hela cells infected with adenovirus. *Virology*, 1960, (11), 590-602.
261. PEREIRA (H.-G.). — Antigenic structure of non-infectious adenovirus materials. *Nature*, 1960, (186), 571-572.
262. PEREIRA (H.-G.) et KELLY (B.). — Dose-response curves of toxic and infective actions of adenovirus in HeLa cell cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 1957, (17), 517-524.
263. PEREIRA (H.-G.) et VALENTINE (R.-C.). — Infectivity titrations and particles counts of adenovirus type 5. *J. Gen. Microbiol.*, 1958, (19), 178-181.
264. PEREIRA (H.-G.), ALLISON (A.-C.) et BALFOUR (B.). — Multiplication of adenovirus type 5 studied by infectivity titrations and by the fluorescent antibody technique. *Virology*, 1959, (7), 300-314.
265. PEREIRA (H.-G.), ALLISON (A.-C.) et FARTHING (C.-P.). — Study of adenovirus antigens by immunoelectrophoresis. *Nature*, 1959, (183), 895-896.
266. PEREIRA (M.-S.), PEREIRA (H.-G.) et ALLISON (A.-C.). — Use of gel diffusion precipitation test in the diagnosis of adenovirus infections. *Lancet*, 1959, (1), 551-552.
267. PERES (G.). — Les protéines sériques et leurs modifications sous l'influence de la surrénalectomie, des variations des tensions gazeuses et de divers types d'agression. *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Lyon, 1955.
268. PHILIPSON (L.). — Separation on DEAE cellulose of components associated with adenovirus reproduction. *Virology*, 1960, (10), 459-465.
269. PHILIPSON (L.), ALBERTSSON (P.-A.) et FRICK (G.). — The purification and concentration of viruses by aqueous polymer phase systems. *Virology*, 1960, (11), 553-571.
270. PIERCE (C.-H.) et KNOX (A.-W.). — Ciliocytophthoria in sputum from patients with adenovirus infections. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, (104), 492-495.
271. PIZZI (M.). — Sampling variations of the fifty per cent end point, determined by the REED and MUENCH (BEHRENS) method. *Human Biol.*, 1950, (22), 151-190.
272. PORTOCALA (R.), BOERU (V.), ADERCA (I.) et SAMUEL (J.). — Effets cytopathogènes de l'acide désoxyribonucléique extrait d'un adénovirus. *C. R. Acad. Sci.* 1961, (252), 362-363.
273. PRIER (J.-E., D.-V.-M.) et LE BEAU (R.-W., A.-B.). — Cellular lesions in monkey kidney epithelium induced by adenoviruses and viruses of simian origin. *Amer. J. Path.*, 1958, (34), 789-801.
274. PRIER (J.-E., D.-V.-M.) et LE BEAU (R.-W., A.-B.). — Studies on the serologic identification of adenovirus. I. Comparison of the hemagglutination, conglutinating complement adsorption and complement fixation tests. *J. Lab. Clin. Med.*, 1958, (51), 495-500.

275. PRUNIERAS (M.), CHARDONNET (Y.) et SOHIER (R.). — Sur les lésions cellulaires provoquées par les adénovirus 7 et 7a. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, (93), 798-800.
276. PRUNIERAS (M.) et CHARDONNET (Y.). — Effet cytopathogène des adénovirus type 7 et 7a. *Presse Méd.*, 1958, (32), 718-720.
277. PRUNIERAS (M.) et CHARDONNET (Y.). — Etude microcinématographique en contraste interférentiel des cellules épidermiques cultivées in vitro. *Path. Biol.*, 1960, (8), 687-696.
278. PRUNIERAS (M.), CHARDONNET (Y.) et SOHIER (R.). — Effets cytopathogènes des adénovirus type 5 : II. Etude cytochimique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1962, (102), 24-35.
279. PRUNIERAS (M.), CHARDONNET (Y.) et SOHIER (R.). — Effets cytopathogènes des adénovirus type 5. IV. Etude cinétique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1962, (103), 484-504.
280. QUILLIGAN (J.-J.), ADRIAN (J.) et ALENA (B.). — The isolation of 21 strains of type 8 adenovirus : from an outbreak of epidemic keratoconjunctivitis. *Amer. J. Ophthalmol.*, 1959, (48), 238-246.
281. REED (L.-J.) et MUENCH (H.). — A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer. J. Hyg.*, 1938, (27), 493-497.
282. ROBBINS (F.-C.), WELLER (T.-H.) et ENDERS (J.-F.). — Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue cultures : II. The propagation of the poliomyelitis viruses in roller tube cultures of various human tissues. *J. Immunol.*, 1952, (69), 673-694.
283. ROIZMAN (B.). — Virus infection of cells in mitosis. I. Observations on the recruitment of cells in karyokinesis into giant cells induced by herpes simplex virus and bearing on the site of virus antigen formation. *Virology*, 1961, (13), 387-401.
284. ROIZMAN (B.) et SCHLUEDERBERG (A.-E.). — Virus infection of cells in mitosis. II. Measles virus infection of mitotic Hep 2 cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1961, (106), 320-323.
285. ROIZMAN (B.) et SCHLUEDERBERG (A.-E.). — Virus infection of cells in mitosis. III. Cytology of mitotic and amitotic Hep 2 cells infected with measles virus. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1962, (28), 35-53.
286. ROSE (H.-M.), MORGAN (C.), GODMAN (G.-C.) et HOWE (C.). — Physical and chemical aspects of the intracellular development of type 5 adenovirus. VII^e Congrès International de Microbiologie (Stockholm, 1958). Résumés des travaux présentés à session de rapports. Edit. Tunevall, C., 1958.
287. ROSE (H.-M.) et MORGAN (C.). — Fine structure of virus-infected cells. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1960, (14), 217-240.
288. ROSEN (L.). — Hemagglutination by adenoviruses. *Virology*, 1958, (5), 574-577.
289. ROSEN (L.). — A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. *Amer. J. Hyg.*, 1960, (71), 120-128.
290. ROSEN (L.), BARON (S.) et BELL (J.-A.). — Four newly recognized adenoviruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1961, (107), 434-437.
291. ROSS (J.-D.) et SYVERTON (J.-T.). — Use of tissue cultures in virus research. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1957, (11), 459-508.
292. ROSS (E.) et GINSBERG (H.-S.). — Hemagglutination with adenoviruses. Nature of viral antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, (98), 501-505.
293. ROWE (W.-P.), HUEBNER (R.-J.), GILMORE (L.-K.), PARROTT (R.-H.) et WARD (T.-G.). — Isolation of cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1953, (84), 570-573.

294. ROWE (W.-P.), HUEBNER (R.-J.), HARTLEY (J.-W.), WARD (T.-G.) et PARROTT (R.-H.). — Studies of the adenoidal-pharyngeal-conjunctival (APC) group of viruses. *Amer. J. Hyg.*, 1955, (61), 197-218.
295. ROWE (W.-P.), HARTLEY (J.-W.) et HUEBNER (R.-J.). — Additional serotypes of the APC virus group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, (91), 260-262.
296. ROWE (W.-P.), HARTLEY (J.-W.) et HUEBNER (R.-J.). — Serotype composition of the adenovirus group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, (97), 465-470.
297. ROWE (W.-P.), HARTLEY (J.-W.), ROIZMAN (B.) et LEVY (H.-B.). — Characterization of a factor formed in the course of adenovirus infection of tissue cultures causing detachment of cells from glass. *J. exper. Med.*, 1958, (108), 713-729.
298. SALK (J.-E.) et WARD (E.-N.). — Some characteristics of a continuously propagating cell derived from monkey heart tissue. *Science*, 1957, (126), 1338-1339.
299. SCHAEFFER (P.). — La notion d'espèce après les recherches récentes de génétique bactérienne. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, (94), 167-178.
300. SCHERER (W.-F.). — Agglutination of a pure strain of mammalian cells (L strain, EARLE) by suspensions of vaccinia virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1952, (80), 598-602.
301. SCHERER (W.-F.), SYVERTON (J.-T.) et GEY (G.-O.). — Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. exper. Med.*, 1953, (97), 695-710.
302. SCHLUEDERBERG (A.). — The role of antibody in the persistence of HeLa cell-cultures infected with adenovirus type 2. *Fed. Proc.*, 1960, (9, Pt 1), 402.
303. SCHMIDT (G.) et THANNHAUSER (J.). — A method for determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1945, (161), 83-89.
304. SCHNEIDER (W.-C.). — Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 1945, (161), 293-303.
305. SCHWERDT (C.-E.) et SCHAFER (F.-L.). — Purification of poliomyelitis viruses propagated in tissue culture. *Virology*, 1956, (2), 665-678.
306. SHARPLESS (G.-R.), DEFENDI (V.) et COX (H.-R.). — Cultivation in tissue culture of virus of avian lymphomatosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, (97), 755-757.
307. SHARPLESS (G.-R.), LEVINE (S.), DAVIES (M.-C.) et ENGLERT (M.-E.). — GAL-virus : its growth cycle in tissue culture and some of its properties. *Virology*, 1961, (13), 315-322.
308. SHELOKOV (A.), VOGEL (J.-E.) et LOTTA CHI. — Hemadsorption (adsorption-hemagglutination) test for viral agents in tissue culture with special reference to influenza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, (97), 802-809.
309. SMADEL (J.-E.) et HOAGLAND (C.-L.). — Elementary bodies of vaccine *Bact. Rev.*, 1942, (6), 79-110.
310. SOHIER (R.). — Sur la présence en France des infections dues aux virus du groupe APC (ROWE et HUEBNER) ou RI-67 (HILLEMANN). Note préliminaire. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, (90), 222-225.

311. SOHIER (R.), PEILLARD (M.-M.) et CHARDONNET (Y.). — La réaction de fixation du complément pour le diagnostic de l'infection herpétique. Antigènes préparés à partir des liquides amniotiques et allantoïques infectés. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, (89), 489-504.
312. SOHIER (R.), PEILLARD (M.-M.), GINESTE (J.) et FREYDIER (J.). — Microméthode en tubes pour la réaction de fixation du complément appliquée au diagnostic des infections à virus. *Ann. Biol. Clin.*, 1956, (14), 281-291.
313. SOHIER (R.), CHARDONNET (Y.) et FREYDIER (J.). — La réaction de fixation du complément au cours et au décours des infections à adénovirus. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, (98), 204-210.
314. SOHIER (R.), PRUNIERAS (M.) et CHARDONNET (Y.). — Recherches cytochimiques préliminaires sur le cycle intracellulaire des adénovirus. *Path. Biol.*, 1960, (8), 885-893.
315. SQUERI (L.) et PERNICE (A.). — Osservazioni sulla specificità della reazione di emoagglutinazione tannico-indotta per gli adenovirus. *Ann. Sclavo*, 1960, (2), 225-234.
316. STEINMAN (H.-G.) et MURTAUGH (P.-A.). — Isoelectric precipitation of adenovirus and of its complement-fixing antigen. *Virology*, 1959, (7), 291-299.
317. STUART (D.-C.), FOGH (J.) et PLAGER (H.). — Cytoplasmic crystals in FL cells infected with an unclassified enteric virus (presumably a new type of Echo). *Virology*, 1960, (12), 321-324.
318. SUNAGA (H.), TAYLOR (R.-M.) et HENDERSON (J.-R.). — Comparative sensitivity of viruses to treatment with diethylether and sodium desoxycholate. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1960, (9), 419-424.
319. SWIFT (H.). — The fine structure of annulate lamellae. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, (2), suppl., 415-418.
320. SYVERTON (J.-T.), SCHERER (W.-F.) and ELWOOD (P.-M.). — Studies of the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. V. The application of strain HeLa human epithelial cells for isolation and typing. *J. Lab. Clin. Med.*, 1954, (43), 286-302.
321. SYVERTON (J.-T.). — Cellular response to viral infection. *Path. Biol.*, 1961, (18), 685-689.
322. TAMM (I.) et OSTERHOUT (S.). — On the role of nucleic acids in virus synthesis. *Fed. Proc.*, 1959, (18), 600.
323. TENENBAUM (E.). — Appearance of crystalline needles in monkey kidney cell cultures infected with poliomyelitis virus and incubated at 22°-30°C. *Nature*, 1959, (184), 1657-1658.
324. THALER (I.). — Virus Eiweisskristalle in Phagus grandifolius. *Protoplasma*, 1960, (53), 106-112.
325. TOUSIMIS (A.-J.) et HILLEMANN (M.-R.). — Electron microscopy of type 4 adenovirus strain RI-67. *Virology*, 1957, (4), 499-508, (69), 645-672.
326. TRENTIN (J.-J.). — The quest of human cancer viruses. *Science*, 1962, (137), 835-841.
327. VALENTINE (R.-C.) et HOPPER (P.-K.). — Polyedral shape of adenovirus particles as shown by electron microscopy. *Nature*, 1957, (190), 928.
328. VEEN (Van der J.) et KOK (G.). — Isolation and typing of adenoviruses recovered from military recruits with acute respiratory disease in the Netherlands. *Amer. J. Hyg.*, 1957, (65), 119-129.

329. VEEN (Van der J.), BOTS (L.) et MES (A.). — Establishment of two human cells strains from kidney and reticulosarcoma of lung. *Arch. Virusforsch.*, 1958, (8), 230-238.
330. VENDRELY (R.) et VENDRELY (C.). — L'acide désoxyribonucléique (DNA) substance fondamentale de la cellule vivante. Legrand A. et C^{ie}, Edit., Paris, 1957.
331. VERVILLE (E.), CONNOR (J.-D.) et SIGEL (M.-M.). — Double infection of tissue culture cells with CA virus and adenovirus. *Virology*, 1961, (13), 261-262.
332. WALKER (D.-L.). — In vitro cell-virus relationships resulting in cell-death. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1960, (14), 177-194.
333. WARREN (J.) et CUTCHINS (E.-C.). — General characteristics and viral susceptibility of bovine embryonic tissue cultures. *Virology*, 1957, (4), 297-304.
334. WEINSTEIN (N.-J.), ALEXANDER (C.), YOSHIHARA (G.-N.) et KIRBY (W.-M.-M.). — Preparation of human amnion tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, (92), 535-538.
335. WELLER (T.-H.), ENDERS (J.-F.), ROBBINS (F.-C.) et STODDARD (M.-B.). — Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue cultures. I. The propagation of poliomyelitis viruses in suspended cell cultures of various human tissues. *J. Immunol.*, 1952.
336. WELLER (T.-H.) et COONS (A.-H.). — Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1954, (86), 789-794.
337. WERNER (G.-H.). — Complement fixing antibodies in guinea-pigs immunized with type 3 adenopharyngoconjunctival virus. *J. Bacteriol.*, 1956, (72), 568-569.
338. WIGAND (R.) et BAUER (H.). — Grundlegende Unterschiede in den Eigenschaften die Hämagglutirube verscheidener Adenovirus-typen. *Zbl. Bakteriол. Parasitenkde Infekt. Krankh. Hyg.*, 7, *Dtsch.*, 1962, (184), 60-65.
339. WILCOX (W.-C.) et GINSBERG (H.-S.). — Effect of P. fluorophenylalanine on adenovirus synthesis. *Fed. Proc.*, 1961, (20/1, pt. 1), 445.
340. WILCOX (W.-C.) et GINSBERG (H.-S.). — Purification and immunological characterization of type 4 and type 5 adenovirus soluble antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1961, (47), 512-524.
341. WOLFF (H.-L.). — Reproduction of Mumps virus in the chorio-allantoic membrane. *Nature*, 1955, (176), 604-605.
342. WORBE (J.-F.). — Recherches sur l'absorption intestinale des sucres chez la grenouille. Influence de quelques facteurs physiques. *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Lyon, 1959.
343. YOUNGNER (J.-S.). — Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1954, (85), 202-205.
344. ZUSCHEK (F.). — Studies of the hemagglutinins of type 3, 4 and 7 adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1961, (107), 27-30.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	7
I. — APPORTS ET EMPRUNTS DES TECHNIQUES VIROLOGIQUES A LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE	7
A. — Matériel et méthodes	7
B. — Les problèmes étudiés	8
C. — Résultats acquis dans ce domaine	9
II. — BUT DE CE TRAVAIL	10
III. — PLAN DE CE TRAVAIL	11

PREMIÈRE PARTIE

METHODES EXPERIMENTALES UTILISEES DANS NOS RECHERCHES

CHAPITRE 1. — ETABLISSEMENT DU COUPLE CELLULES-VIRUS	15
I. — LES CELLULES	15
A. — Données actuelles sur les cellules utilisées ..	15
B. — Les cellules HeLa	16
1) Origine et subculture	16
2) Milieu de croissance	18
3) Milieu de survie	18
4) Morphologie	18
5) Intérêts des cellules HeLa	18
C. — Les cellules T1	18
1) Origine et subculture	18
2) Milieu de croissance	18
3) Milieu de survie	19
4) Morphologie	19
5) Intérêt des cellules T1	19
D. — Les cellules amniotiques d'origine humaine ..	19
1) Origine	19
2) Milieu de croissance	20
3) Milieu de survie	20

4) Morphologie	20
5) Intérêt des cellules amniotiques humaines	20
E. Les cellules de reins de lapin	20
1) Origine	20
2) Milieu de croissance	21
3) Milieu de survie	21
4) Morphologie	21
5) Intérêt des cellules de reins de lapin	21
II. — L'AGRESSEUR VIRAL : L'ADÉNOVIRUS	21
A. — Données actuelles sur les adénovirus utilisés	21
B. — Les raisons du choix	22
III. — MODE PRATIQUE D'ÉTABLISSEMENT DU COUPLE CELLULES- VIRUS	23
A. — Problème du récipient	23
1) Cultures cellulaires en tubes en vue de l'appréciation globale de l'état des cellules	23
2) Cultures cellulaires sur lames minces en tubes spéciaux en vue de l'observation de détails morphologiques	24
3) Cultures cellulaires en chambres pour la microcinématographie	25
4) Cultures cellulaires en flacons pour le renou- vellement du stock de suspension de virus	25
B. — Problème de la concentration en virus	26
1) Cultures en tubes en vue de l'appréciation globale de l'état des cellules	27
2) Cultures cellulaires sur lames minces en tubes spéciaux en vue de l'observation de détails morphologiques	27
3) Cultures cellulaires en chambres pour la microcinématographie	28
4) Cultures cellulaires en flacons pour le renou- vellement du stock de suspension de virus	28
CHAPITRE 2. — METHODES D'INVESTIGATION DE L'AGRESSION CELLULAIRE PAR L'ADÉNOVIRUS	31
I. — MOYENS D'APPRÉCIATION DE LA MULTIPLICATION VIRALE INTRACELLULAIRE ET DE L'EFFET TOXIQUE	31
A. — Méthodes directes quantitatives	31

B. — Méthodes indirectes	36
1) Méthode faisant intervenir les modifications cellulaires morphologiques	36
2) Méthodes faisant intervenir la production d'un facteur soluble antigénique spécifique	36
II. — MOYENS D'ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE LA CELLULE AU COURS DE LA MULTIPLICATION VIRALE ET DE L'EFFET TOXIQUE	37
A. — Méthodes statiques	37
1) Etudes morphologiques	37
2) Etudes cytochimiques	38
B. — Méthode dynamique	40

DEUXIÈME PARTIE

ETUDE DE LA MULTIPLICATION DU VIRUS DANS LA CELLULE PAR DES METHODES GLOBALES

CHAPITRE 1. — RESULTATS ACQUIS AVEC DES METHODES DIRECTES	45
I. — RÉSULTATS	45
A. — Extraction des milieux de culture (Surnageants S)	45
1) Extraction des nucléotides acidosolubles ..	45
2) Extraction des RNA	46
3) Extraction des DNA	46
4) Extraction des protéines	46
B. — Extraction de la fraction cellulaire (Homogénéisés H)	46
1) Extraction des nucléotides acidosolubles ..	46
2) Extraction des RNA	52
3) Extraction des DNA	52
4) Extraction des protéines	52
II. — DISCUSSION	52
A. — Extraction par des procédés brutaux	52
B. — Extraction par des moyens peu dénaturants ..	62
C. — Résumé	62
CHAPITRE 2. — RESULTATS ACQUIS AVEC LES METHODES INDIRECTES	63

I. — RÉSULTATS	63
A. — Méthodes faisant intervenir les modifications cellulaires morphologiques	63
1) Etude de la sensibilité et de la réceptivité cellulaire à l'agression virale	63
2) Cinétique de la multiplication de l'adénovirus type 1	67
3) Cinétique de la production d'adénovirus type 5	77
4) Résumé	77
B. — Méthodes faisant apparaître la production d'un facteur soluble	80
1) Etude de la sensibilité et de la réceptivité cellulaires à l'agression virale	80
2) Cinétique de la production de facteur soluble dans les cellules infectées par l'adénovirus type 1	81
3) Cinétique de la production du facteur soluble dans les cellules infectées par l'adénovirus type 5	93
4) Essai d'extraction de la fraction soluble des cellules	93
5) Résumé	98
C. — Rapport entre l'apparition et l'évolution de la fraction soluble et l'apparition et l'évolution du matériel infectant	100
1) Cinétique de la multiplication de l'adénovirus type 1 sur cellules de reins humains (souche T1)	100
2) Cinétique de la multiplication de l'adénovirus type 1 sur cellules de reins de lapin	103
3) Cinétique de la multiplication de l'adénovirus type 1 sur cellules HeLa	103
4) Résumé	103
II. — DISCUSSION	104
A. — Méthodes faisant intervenir les modifications cellulaires morphologiques	104
1) Etude de la sensibilité et de la réceptivité cellulaires à l'agression virale	104
2) Cinétique de la réponse cellulaire quel que soit le type d'adénovirus	109
3) Valeur de la méthode employée	114
4) Résumé	115
B. — Méthodes faisant intervenir la production d'un facteur soluble antigénique spécifique	117
1) Etude de la sensibilité et de la réceptivité cellulaires à l'agression virale	117
2) Cinétique de la réponse cellulaire quel que soit le type d'adénovirus	120
3) Valeur de la méthode employée	122
4) Résumé	123

C. — Autres méthodes indirectes utilisables	124
1) Hémagglutination directe	124
2) Hémadsorption	127
3) Hémagglutination indirecte	127
4) Conglutination	128
5) Test de précipitation et de diffusion dans le gel	128
6) Résumé	128

TROISIÈME PARTIE

REACTIONS DE LA CELLULE AU COURS DE L'AGRESSION VIRALE

CHAPITRE 1. — RESULTATS ACQUIS PAR LES METHODES STATIQUES	131
I. — RÉSULTATS	131
A. — Etudes morphologiques	131
1) Examen « in vivo » au faible grossisse- ment	131
2) Examen « in vivo » au fort grossissement	133
3) Examen au fort grossissement après colo- ration	134
B. — Etudes cytochimiques	139
1) Etude des acides nucléiques	139
2) Etude des protéines	141
3) Etude des sucres	141
4) Etude enzymatique	141
C. — Résumé	143
II. — DISCUSSION	143
A. — Etudes morphologiques	143
1) Examen « in vivo » au faible grossisse- ment	143
2) Examen au fort grossissement après colo- ration	146
3) Résumé	152
B. — Etudes cytochimiques	153
1) Etude des acides nucléiques	153
2) Etude des protéines	157
3) Etude des sucres	158
4) Etude des lipides	158
5) Etude enzymatique	158
CHAPITRE 2. — RESULTATS ACQUIS PAR LES ETUDES DYNA- MIQUES	161
I. — RÉSULTATS	162

A. — Etude de la mort cellulaire par effet spécifique du virus	162
1) Formation de la masse centrale	162
2) Formation des cristaux	162
3) Résumé	163
B. — Etude de la mort cellulaire par effet non spécifique du virus	163
C. — Etude des modifications de surface cellulaire observées au cours de l'infection	164
II. — DISCUSSION	164
A. — Valeur de la méthode employée	164
B. — Méthodes de purification	166
CHAPITRE 3. — RESULTATS ACQUIS PAR D'AUTRES METHODES	169
I. — MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	169
A. — Corrélation entre les observations au microscope ordinaire et au microscope électronique	169
B. — La microscopie électronique et les problèmes des formations particulières	171
1) Etude des cristaux	171
2) Etude des membranes à feuillets multiples	171
C. — La microscopie électronique, moyen direct d'estimation de la multiplication du virus	172
D. — Renseignements fournis par la microscopie électronique sur la structure de la particule virale	173
1) Etude des suspensions virales purifiées ..	173
2) Etude des coupes ultrafines de cellules infectées	174
3) Intérêt de la recherche de la structure des particules virales au microscope électronique	175
E. — Résumé	176
II. — L'IMMUNOFLUORESCENCE	176
CONCLUSIONS	179
OUVRAGES GÉNÉRAUX	187
BIBLIOGRAPHIE	189
TABLE DES MATIÈRES	209

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE :

ESSAIS DE CULTURE DE CELLULES PROVENANT
D'UN MOLLUSQUE : (*MYTILUS EDULIS* L).

Vu :

Les Membres du Jury,

MM. PERES
CHANEL
LUBET
SOHIER

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, le 6 mars 1963

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS

